

分类号_____

论文编号_____

密 级_____

海军军医大学

硕士学位论文

Toll 样受体 9 及其信号通路在甲状腺相关眼病 发病中的作用的研究

Study on the Role of Toll Like Receptor 9 and Its Signaling Pathway in the Pathogenesis of Thyroid Associated Ophthalmopathy

研究生姓名： 陈子瑜 学号： 20151310

指导教师： 魏锐利 教授 海军军医大学附属长征医院

学科、专业： 眼科学

学位类型： 临床医学专业学位

答辩日期： 2018 年 5 月

二〇一八年五月

海军军医大学

硕士学位论文

Toll 样受体 9 及其信号通路在甲状腺相关眼病 发病中的作用的研究

Study on the Role of Toll LikeReceptor 9 and Its Signaling Pathway in the Pathogenesis of Thyroid Associated Ophthalmopathy

研究生姓名： 陈子瑜

指导教师： 魏锐利 教授

专业名称： 眼科学

培养单位： 海军军医大学附属长征医院

二〇一八年五月

目 录

摘要	- 1 -
Abstract.....	- 3 -
缩略词表	- 6 -
前 言	- 8 -
一、甲状腺相关眼病概述	- 8 -
二、TAO 研究现状	- 9 -
材料与amp;方法	- 12 -
一、实验材料及仪器	- 12 -
二、实验方法	- 14 -
实验结果	- 28 -
一、OFs 细胞的培养	- 28 -
二、实时荧光定量 PCR（Quantitative Real-time PCR）测定各组 OFs 中 TLR9 mRNA 表达水平	- 29 -
三、CpG-ODN 激活 TLR9 后，OFs 增殖活力的变化	- 30 -
四、CpG-ODN 刺激 OFs 后炎症因子 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ mRNA 表达水平变化	- 34 -
五、TLR9 mRNA 表达水平下调后，再用 CpG-ODN 刺激 OFs， qRT-PCR 检测 IL-6、ICAM-1、IFN- γ mRNA 表达水平	- 36 -
讨 论	- 38 -
结 论	- 42 -
参考文献	- 43 -
综 述	- 45 -
在读期间发表amp;论文和参加科研工作情况说明	- 55 -
致 谢	- 56 -

摘要

研究目的

甲状腺相关眼病 (thyroid associated ophthalmopathy, TAO) 是眼眶疾病中最常见的一种类型。目前的研究认为其是一种自身免疫性疾病, 与甲状腺功能紊乱有关, 常伴发于毒性弥漫性甲状腺肿 (Graves' disease, GD)。国外研究显示, 每百万人群中 Graves 病发病率为 210/年, 男女比例为 1:3.9, 高峰年龄为 40-60 岁, 而 TAO 的发病率为 42.2/百万/年, 约为 Graves 甲亢发病率的 20.1%。目前 TAO 的确切发病机制仍不明确, 缺乏针对性的治疗措施, 现有治疗方案多以控制病情为主。同时由于 TAO 治疗的前提是正确的临床分期, 而目前临床普遍采用的 CAS 评分系统存在一定的主观性, 尤其对于非专门从事 TAO 诊治的眼科和全科医生, 很难做到准确分期。国外有研究发现, Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 激活可促进浆细胞样 DC (pDC) 分泌 IFN- α , 与 SLE 的疾病活动性和预后密切相关。而我们前期研究发现活动期 TAO 患者外周血单个核细胞中 TLR9 表达明显高于正常人群。因此我们推测 TLR9 是否同样参与了 TAO 的发病过程, 为了验证这一设想, 通过实验验证活动期 TAO 患者眼眶成纤维细胞 (orbital fibroblasts, OFs) 是否高表达 TLR9, 并与稳定期 TAO 进行对比, 以期发现二者之间 TLR9 表达的差异。进一步探究 TLR9 与 OFs 增殖、炎症因子释放之间的联系, 了解 TLR9 在 TAO 发病中的作用, 为寻找 TAO 治疗靶点提供依据和方向。

研究方法

本课题通过组织块培养法, 分别从活动期 TAO 患者、稳定期 TAO 患者及排除免疫性疾病为改善外观而行眼眶减压手术的正常人眼眶脂肪结缔组织中分离纯化 OFs。用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 方法分析各组 TLR9 mRNA 表达水平的差异。用 TLR9 特异性配体——人工合成的含有 CpG 基序的寡脱氧核苷酸 (CpG-ODN) 刺激各组细胞, 分别于刺激后 0h、6h、12h、24h 用 qRT-PCR 方法检测白介素-6 (interleukins-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) mRNA 表达水平的变化趋势, 并分别用不同浓度 CpG ODN 刺激各组 OFs, 作用不同时间, 通过 CCK8 法测定各组细胞 OD 值的变化, 计算细胞活力, 了解 TLR9 与 OFs 增殖之间的联系。最后用特异性小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 下调 TLR9 mRNA 的表达水平, 再次用 qRT-PCR 法检测活动期 TAO

组 TLR9、IL-6、IFN- γ 、ICAM-1 mRNA 表达水平,验证 TLR9 与炎症因子 IL-6、IFN- γ 、ICAM-1 合成和分泌之间的相关性。

结果

1、经组织块培养法成功获得各组 OFs,经形态学及免疫组化鉴定符合成纤维细胞特征。

2、TLR9 mRNA 在活动期 TAO 组 OFs 中表达水平明显高于正常对照组,而在稳定期 TAO 组中表达下调。

3、CpG-ODN 刺激各组细胞后,活动期 TAO 组 OFs 活力明显升高,而稳定期 TAO 组和正常对照组无明显变化,这种作用在 CpG-ODN 作用 48h 后显现,并且存在剂量依赖,在 200nM 时最明显。

4、CpG-ODN 刺激各组细胞后,活动期 TAO 组 OFs 相关炎症因子(IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ) mRNA 的表达水平均不同程度升高,稳定期 TAO 组 OFs 升高幅度不明显,部分出现下调。

5、用 siRNA 下调活动期 TAO 组 OFs TLR9 mRNA 表达水平后,相关炎症因子(IL-6、IFN- γ 、ICAM-1) mRNA 的表达水平亦呈现下降趋势,呈正相关。

结论

1、组织块培养法获取 OFs 是可靠而有效的。

2、TAO 活动期患者来源的 OFs 高表达 TLR9,而稳定期患者来源的 OFs 相对低表达,提示 TLR9 可能参与 TAO 活动期炎症反应过程。

3、用特异性配体激活 TLR9 后,OFs 的细胞活力明显提高,提示 TLR9 被激活可能参与了 TAO 活动期眼外肌增生和眶脂肪增多的病理过程。

4、TLR9 激活后,可诱导活动期 OFs 合成和分泌 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ 等炎症因子,说明 TLR9 可能参与了 TAO 活动期眼眶炎症反应过程。

关键词: 甲状腺相关眼病,眼眶成纤维细胞,寡脱氧核苷酸, Toll 样受体 9, 白细胞介素-6, 血管细胞粘附分子-1

Abstract

Purpose.

Thyroid associated ophthalmopathy(TAO)is the most common type of orbital disease in daily life. Current research consider that it is an autoimmune disease that is associated with thyroid dysfunction and often associated with Graves' disease (GD). Foreign studies show that the incidence of Graves disease per million population is 210/year, the male to female ratio is 1:3.9, the peak age is 40-60 years, and the incidence of TAO is 42.2/million/year, which is about Graves hyperthyroidism is 20.1%. At present, the exact pathogenesis of TAO is still not yet clear. Currently, there are many existing TAO treatment measures for symptomatic treatment, which can only control the condition but still lack an effective targeted drug. Meanwhile, because the premise of TAO treatment is the correct clinical stage, the current clinical CAS score system is subjective, especially for ophthalmologists and general practitioners who are not specialized in TAO diagnosis and treatment. Foreign studies have found that Toll-like receptor 9(TLR9) activation can promote plasmacytoid DC (pDC) secretion of IFN- α , and SLE is closely related to the disease activity and prognosis. Our previous study found that the expression of TLR9 in peripheral mononuclear cells in active TAO patients is significantly higher than that in the normal population. Therefore, we speculate whether TLR9 is also involved in the pathogenesis of TAO. To test this hypothesis, we have verified whether TLR9 is highly expressed by orbital fibroblasts (OFs) in patients with active TAO and compare it with stable TAO. The difference in TLR9 expression is found between the two. To further explore the relationship between TLR9 and OFs proliferation and release of inflammatory factors, to understand the role of TLR9 in the pathogenesis of TAO, and provide basis and direction for the search for TAO therapeutic targets.

Methods.

In this study, OFs is isolated and purified from the orbital adipose connective tissue of active TAO patients, inactive TAO patients, and normal persons performing orbital decompression surgery to improve appearance,who is excluded from immunological disease. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) is used to analyze the difference of TLR9 mRNA expression in each group. TLR9-specific ligands, artificially synthesized oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN), is used to stimulate groups of

cells. qRT-PCR is used to detect IL-6, TNF- α , ICAM-1, IFN- γ mRNA expression levels of the trend of changes at 0, 6, 12 and 24 hours after stimulation. Then we take CCK8 method to determine the changes of cells' OD value in each group, after stimulated by different concentrations with different time, to calculate cell viability and find the relationship between TLR9 and OFs proliferation. Finally, the expression level of TLR9 mRNA is down-regulated by specific small interfering RNA (siRNA). qRT-PCR is used to detect the expression of TLR9, IL-6, IFN- γ and ICAM-1 mRNA in the active group, with the purpose of verifying whether TLR9 is in correlation with the secretion of inflammatory factors IL-6, ICAM-1, IFN- γ .

Results.

1. The groups of OFs are successfully obtained by the tissue culture, the morphological and immunohistochemical identification is consistent with the characteristics of fibroblasts.

2. The expression level of TLR9 mRNA in the OFs of active TAO group is significantly higher than that in the normal control group, while it was down-regulated in the inactive TAO group.

3. After stimulated by CpG-ODN, the cell viability of OFs in active TAO group is increased significantly, but there is no significant change in inactive TAO group and normal control group. This effect appeared after 48h of CpG-ODN stimulation, and there was dose dependence, which was most obvious at 200nM.

4. After stimulated by CpG-ODN, the expression levels of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , ICAM-1, IFN- γ) mRNA in OFs of active TAO group were increased to varying degrees, while the levels in OFs of inactive TAO group were increased slightly or even been down-regulated.

5. After down-regulating the expression of TLR9 mRNA in OFs of active TAO group by siRNA, the expression levels of related inflammatory factors (IL-6, ICAM-1, IFN- γ) mRNA also show a downward trend, showing a positive correlation.

Conclusions.

1. Tissue block culture method to obtain OFs is reliable and effective.

2. TLR9 is highly expressed in OFs from patients with active TAO, while it's relatively low in inactive group, suggesting that TLR9 may be involved in the TAO active

inflammatory response.

3. After activation of TLR9 with specific ligands, the cell viability of OFs significantly increased, suggesting that activation of TLR9 may be involved in the pathological process of extraocular muscle hyperplasia and orbital adipose tissue hyperactivity in patients with TAO.

4. After activation of TLR9, active cytokines, such as IL-6, TNF- α , ICAM-1, IFN- γ , can be induced to synthesize and secrete in OFs, indicating that TLR9 may be involved in the process of active ocular inflammatory reaction in TAO patients.

KEY WORDS: thyroid associated ophthalmopathy; orbital fibroblasts; CpG-ODN; Toll-like receptor 9; interleukin- 6; intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1)

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
TAO	thyroid associated ophthalmopathy	甲状腺相关眼病
GO	Graves' ophthalmopathy	格雷夫斯眼病
TLR9	Toll-like receptor 9	Toll 样受体 9
GD	Graves' disease	毒性弥漫性甲状腺肿
pDC	Plasma cell like dendritic cells	浆细胞样树突状细胞
OFs	orbital fibroblasts	眼眶成纤维细胞
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR	实时荧光定量聚合酶链式反应
IL	interleukin	白介素
CpG-ODN	CpG-Oligodeoxynucleotides	含有 CpG 基序的寡脱氧核苷酸
ICAM-1	intercellular adhesion molecular-1	细胞间粘附分子-1
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
IFN- γ	interferon- γ	干扰素- γ
mRNA	message RNA	信使 RNA
OD	optical density	光密度
siRNA	Small interfering RNA	小干扰核糖核酸
CAS	clinical activity score	临床活动性评分
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor	促甲状腺激素受体
TLRs	Toll-like receptors	Toll 样受体
GAG	glycosaminoglycan	氨基葡聚糖
PRR	pattern recognition receptor	跨膜模式识别受体
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene88	髓样分化初反应基因 88
IRF	interferon-regulatory factor	干扰素调节因子
AP-1	Activator protein-1	活化蛋白-1
APC	antigen-presenting cell	抗原提呈细胞
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase	白细胞介素-1 受体相关激酶
SLE	systemic lupus erythematosus	系统性红斑狼疮

PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	病原相关分子模式
DMEM	Dulbecco's modified Eagle media: nutrient mixture F-12	改良 Eagle 培养基
DAMPs	damage related molecular model	损伤相关分子模式
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲亚砜
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
nM	nmol/L	纳摩尔每升
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
FAM	hydroxyl fluorescein	羟基荧光素

前言

一、甲状腺相关眼病概述

甲状腺相关性眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO)是一种发病率最高的眼眶疾病,目前的研究认为其是一种自身免疫性疾病,与甲状腺功能紊乱有关。以往学术界对该病的名称没有统一,包括内分泌性突眼、甲状腺眼病、浸润性突眼、免疫性眼眶病、免疫相关性眼病、甲状腺眼眶病等等,近年来学术界基本统一称其为甲状腺相关性眼病,而其中又以伴发于 Graves 病的 Graves 眼病(Graves' ophthalmopathy, GO)占绝大多数,国外的研究多集中在 Graves 眼病,因此目前甲状腺相关眼病的临床流行病学特征,多参照 Graves 眼病。

瑞典的一项研究显示,一般人群中 Graves 病发病率为每年 210 人/百万,男女比例为 1:3.9,高峰年龄为 40-60 岁,而 Graves 眼病的发病率为每年 42.2 人/百万,约为 Graves 病发病率的 20.1%^[1]。其中,多数为轻度 TAO 患者,病情较轻且有自限性,中重度和极重度患者相对少见,在 Graves 病患者中的患病率约为 4.9%-6.1%^[2, 3]。目前国内尚无 TAO 发病率的准确数据,缺乏大样本的现况调查,但据一些小范围的流行病学调查显示,Graves 病的发病率呈逐年上升趋势,其中约有 20% 的甲亢患者会出现 TAO,据此推测 TAO 的发病率也在逐年增加。TAO 的临床表现复杂多样,病情较轻的患者可以出现不同程度的眼球突出、眼睑退缩导致外观改变,重者可以导致复视、视力下降甚至失明。此外,TAO 造成的眼部症状和容貌改变也给患者带来了极大的心理创伤,患者丧失了劳动力,无法进行正常社交活动,严重地影响了生活质量,同时也给社会经济带来了沉重负担。

TAO 的发病机制尚不明确,其发病可能与多种因素相关,包括遗传因素、环境因素以及自身免疫等。其本质是自身免疫紊乱,自身抗体识别眼眶成纤维细胞表面抗原,与之结合后,激活自身免疫反应,释放相关炎症因子,导致眼眶组织炎症反应,成纤维细胞异常增生,使眶内脂肪组织增多,眼外肌增粗,导致眼球突出、眼睑退缩、眼睑肿胀、斜视等临床表现,使患者外观发生改变,甚至导致眼部功能障碍,严重影响患者生活质量。

随着近年来对该病的深入研究,尤其是国外多中心的临床研究结果发布,目前对该病的治疗已取得了一些共识。欧洲 GO 专家组(EUGOGO)于 2016 年 3 月也发布了新的 GO 管理指南,对该病的诊断和治疗做了进一步规范。目前治疗上主要根据疾病分期分为两大类,针对活动期患者,轻度的仅需要临床观察,而中重度以上的患者主要治疗方案为大剂量激素冲击;针对稳定期患者,可根据临床表现,施行眼眶减压术、眼睑退缩矫正术和复视矫正术等。这些治疗措施对患者病情的控制和生活质量的提高

起到了极大的作用，给 TAO 患者带来的福音。但这些终究是对症治疗措施，为了尽量避免病情稳定后施行手术来改变外观等，临床上迫切需要一种可以对因治疗的方案可以在活动期阻断或者逆转疾病的进程。

同时，对 TAO 的规范治疗，需要建立在合理的分期基础上，因为一旦进入稳定期，如果再给予大剂量激素冲击治疗，患者不但不能获益，还可能因应用激素带来一系列并发症。目前临床上普遍采用的 TAO 分期标准临床活动性评分表 (clinicalactivityscore,CAS)，主要根据患者自觉症状和体征进行评分，CAS 评分 ≥ 3 的归为活动期，否则归为稳定期。这套标准的制定极大的方便了眼科和内分泌科医生的临床诊疗工作，但也存在一定的局限性。该评分表中的项目多数基于患者的主诉和临床医生的观察，存在很大的主观性，对于那些评分在临界值得患者，尤其对于那些不从事 TAO 疾病诊疗的眼科和全科医生而言，准确分期往往很困难。因此，我们想寻找一种检验指标，来有效区分 TAO 活动期与稳定期，使我们的治疗更有的放矢。

二、TAO 研究现状

(一) OFs 在 TAO 发病机制中起关键作用

TAO 是一种自身免疫系统紊乱所导致的疾病，其主要病理过程表现为眼外肌和脂肪/结缔组织的炎症反应。促甲状腺激素受体 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)被认为是最主要的自身抗原，其病变过程涉及自身抗原与抗体反应，眼眶成纤维细胞与 T 细胞、B 细胞、单核巨噬细胞和细胞因子之间的相互作用^[4]。

目前对 TAO 的机制研究认为，OFs 是参与 TAO 发病的关键细胞，可发挥结构和免疫调节作用，并且可表达各种细胞因子和生长因子的细胞表面受体，在体外培养实验中刺激 OFs 可使一些炎症因子的表达升高。眼眶成纤维细胞存在两个细胞亚群：CD90+和 CD90-细胞亚群^[6]。CD90+细胞亚群主要来自眼外肌，其增殖和活化与氨基葡聚糖(glycosaminoglycan,GAG)聚集和眼外肌纤维化相关^[4,5]，CD90-细胞亚群又称前脂肪细胞，经过细胞因子 IL-6 和 TSHR 的刺激，能够向成熟的脂肪细胞分化，这与 TAO 患者眼眶脂肪细胞数量增多有关。

OFs 检测到的相应刺激后，可向效应细胞分化、增殖，通过合成、释放细胞因子、趋化因子等参与炎症反应。研究显示，炎性 T 淋巴细胞可以激活成纤维细胞，促进其增殖，介导这一过程的是 IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 等细胞因子。成纤维细胞在受刺激后能够分泌 IL-6、IL-16、RANTES 等多种细胞因子，刺激 B 细胞分化和 T 细胞迁徙。成纤维细胞与抗原呈递细胞具有相似的功能，可作为第二信使活化淋巴细胞，介导甲状腺眼病早期的细胞免疫反应。

(二) Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 在自身免疫性疾病发病过程中发挥重要作用

目前研究认为, TLRs 是机体免疫应答中的重要细胞表面受体, 属于跨膜模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 家族^[6]。Toll 样受体在固有免疫反应、上调共刺激因子、调节吞噬细胞特异性识别病原体抗原、分泌炎症因子及炎症介质等过程中发挥重要作用, 是获得性免疫和固有免疫的连接点, 可发挥多种生物学功能。

目前发现的 TLRs 有 13 种, 仅有 2 种在人体内未被发现, 它们广泛分布于各种免疫细胞及非免疫细胞 (如上皮细胞、内皮细胞等)。TLRs 发挥生物学作用的信号通路主要有两条, 即髓样分化初反应基因 88 (Myeloid differentiation primary response gene88, MyD88) 依赖的信号通路和非髓样分化初反应基因 88 依赖的信号通路^[7, 8]。TLRs 主要通过激活三种转录因子, 即 NF- κ B、干扰素调节因子 (Interferon-regulatory factor, IRF) 和活化蛋白-1 (Activator protein-1, AP-1), 来增强炎症因子、趋化因子及干扰素的转录^[14, 15]。TLRs 的配体包括微生物结构, 如脂蛋白、脂多糖、病毒 RNA 以及细菌和病毒体内未甲基化的 CpG 片段^[9, 10]。TLRs 与相应的配体结合后, 既能激发炎症反应, 还能对炎症反应的程度、性质以及作用时间进行调节, 从而在激活固有免疫过程中发挥重要作用, 而且还可以通过调节抗原提呈细胞 (antigen-presenting cell, APC), 指导抗原特异性免疫反应^[11]。

TLR9 与其他 TLRs 不同, 主要位于细胞内质网膜上^[12]。研究发现, TLR9 高表达于人体浆细胞样 DC (pDC) 和 B 细胞, 弱表达于单核细胞^[13]。TLR9 的外源性配体是来源于细菌和病毒的 CpG DNA, 内源性的配体主要来源于细胞凋亡产生的 CpG 染色质-IgG 复合物^[10], 还有一类人工合成的含有 CpG 基序 (:5'-X1X2CpGY1Y2-3') 的寡脱氧核苷酸称为 CpG ODN (CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)。CpG DNA 和 CpG ODN 唯有通过 TLR9 才能激活 B 细胞和其他抗原提呈细胞。CpG DNA 激活免疫细胞的过程可分为 DNA 进入细胞、细胞内信号转导、免疫细胞活化 3 个步骤; CpG ODN 则经内吞作用被免疫细胞摄取, 迅速被免疫细胞内化, 之后转移到溶酶体小室。而后, TLR9 则由内质网重新分布到 CpG ODN 聚集的位点 (内体和溶酶体中), 与 CpG ODN 特异性结合, 招募 MyD88, 激活 IRAK (IL-1 receptor-associated kinase)-TRAF6-TAK1 通路, 促进 IL-12、TNF、IL-6、IFN- α 等各种细胞因子和抗原的释放^[14-16]。

研究显示, 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者外周血单个核细胞 TLR7 mRNA 和 TLR9 mRNA 的表达水平明显高于正常人群。活动期狼疮患者外周血中表达 TLR9 的记忆 B 细胞和浆细胞比例明显高于稳定期患者, 且此种 B

细胞的量与血清中抗 dsDNA 的量呈正相关,可能是凋亡细胞释放的内源性核酸分子通过 TLR9 刺激 B 细胞的免疫反应参与了 SLE 的发病^[7]。在 SLE 动物模型中,缺乏 TLRs 衔接蛋白 MyD88 的鼠则不能产生高滴度的自身抗体^[17]。

TLRs 在自身免疫性甲状腺疾病发病中的作用也逐步引发关注。韩国的一项研究发现,TLR10 基因多态性与自身免疫性甲状腺疾病的易感性有关^[18]。Kawashima A 等^[19]发现人甲状腺细胞可表达功能性 TLRs,能同时识别外源性的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns,PAMPs)和内源性的损伤相关分子模式 (damage related molecular model, DAMPs),产生炎性细胞因子、趋化因子和 I 型干扰素,证实了甲状腺细胞可以在没有免疫细胞的辅助下启动天然免疫反应,导致甲状腺炎症,进一步诱发自身免疫反应,该结果使我们对自身免疫性甲状腺疾病病理机制的认知更加深入。

(三) 本课题研究背景及目的

TAO 是一种器官特异性自身免疫性疾病。目前认为环境因素,如感染性病原体,很可能是自身免疫性甲状腺疾病和 TAO 的发病基础^[20],也提示识别感染性病原体的重要受体 TLRs 很可能参与 TAO 的病变过程,但缺乏进一步证据支持。为了探究 TLRs 是否参与了 TAO 的发病过程,我们在前期研究中,分别对 6 例活动期 TAO 患者、6 例稳定期 TAO 患者以及 6 例正常人的眼眶脂肪/结缔组织标本进行了 TLRs mRNA 表达水平的检测,结果显示在活动期 TAO 组 TLR1-TLR10 mRNA 表达较正常对照均有不同程度的上调,其中 TLR9 mRNA 上调幅度最大,为正常对照组的 3.25 倍;在稳定期 TAO 组 TLR1-TLR10 mRNA 表达较正常对照均有不同程度的下调。我们分别采用 5 例活动期 TAO、静止期 TAO 和正常对照眼眶脂肪/结缔组织来源的原代培养的成纤维细胞,qRT-PCR 验证活动期 TAO 组、稳定期 TAO 组的成纤维细胞 TLR9 mRNA 的平均表达量为正常对照组的 2.4 倍和 69%。首次验证了 TLR9 及信号通路的过度活化参与 TAO 的病变过程。同时我们推测,稳定期 TAO 组 TLRs 表达下调以及信号通路功能的抑制,可能与 TAO 疾病从活动期进入稳定阶段有关。

基于上述研究背景,本课题主要初步研究以下内容:

- 1、采用组织块培养法,分离提纯 OFs。
- 2、进一步验证 TLR9 在 TAO 患者中的差异性表达。
- 3、通过细胞实验观察 TLR9 对 OFs 生物学行为的影响,以期借此进一步丰富 TAO 发病机制理论,为其诊治提供新的研究思路。

材料与amp;方法

一、实验材料及仪器

(一) 研究对象

本实验所采用的眼眶成纤维细胞为从临床患者眼眶脂肪结缔组织中分离、培养、纯化所得到的原代细胞,采取传代3-7代的细胞进行试验。实验中所需的三组细胞,分别来源于2017年3月在上海长征医院眼科行眼眶减压手术的活动期TAO患者、稳定期TAO患者及排除自身免疫性疾病但要求行眼眶减压改变外观的正常人中提取的眼眶脂肪结缔组织。

(二) 实验试剂

试剂	供应商	国别
DMEM 高糖液体培养基	Hyclone 公司	美国
四季青胎牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司	中国
青霉素-链霉素双抗溶液	碧云天生物技术公司	中国
EDTA-胰酶	Gibco 公司	美国
无菌 PBS 缓冲液	Hyclone 公司	美国
二甲亚砷 (DMSO)	国药集团化学试剂有限公司	中国
小鼠抗人 Vimentin mAb	厦门慧嘉生物科技有限公司	中国
小鼠抗人 CKmAb	厦门慧嘉生物科技有限公司	中国
小鼠抗人 S-100 mAb	厦门慧嘉生物科技有限公司	中国
小鼠抗人 Desmin mAb	厦门慧嘉生物科技有限公司	中国
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	中国
DEPC 水	上海生工生物工程有限公司	中国
总 RNA 提取试剂盒 (Magen RaPure Total RNA Micro Kit)	上海迈跟生物科技有限公司	中国
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	中国
逆转录试剂盒 (TaKaRa)	宝生物工程 (大连) 有限公司	中国

RR036Q)		
Real Time PCR 试剂盒 (TaKaRa	宝生物工程 (大连) 有限公司	中国
RR820Q)		
PCR 引物	上海生工生物工程有限公司	中国
CCK8 试剂盒 (Cell Counting Kit-8)	碧云天生物技术公司	中国
小干扰 RNA(siRNA)	上海吉玛制药技术有限公司	中国
RFect 小核酸 siRNA/miRNA 转 染试剂	常州百代生物科技有限公司	中国
CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG ODN)	生工生物工程(上海)股份有限公司	中国
AnexinFITC/PI 双染试剂盒	BD 公司	美国

(三) 主要实验仪器

仪器	供应商	国家
液氮罐	成都金凤液氮容器有限公司	中国
冷藏冰箱	海尔集团公司	中国
-80 °深低温冰箱	海尔集团公司	中国
水浴锅	上海跃进医疗器械有限公司	中国
超净工作台	上海跃进医疗器械有限公司	中国
移液器	Eppendorf 公司	德国
CO2 恒温培养箱	Heal Forec 力康生物技术	中国
倒置显微镜	奥林巴斯公司	日本
迷你离心机	Eppendorf 公司	德国
冷冻离心机	贝克曼库尔特有限公司	美国
核酸定量测定仪	Bio-Rad 公司	美国
KHBST-360 酶标仪	上海科华生物工程股份有限公司	中国
NanoDrop 2000 超微量分光 光度计	Thermo Fisher Scientific 公司	美国
ABI 2720 型 PCR 热循环仪	美国应用生物系统公司	美国

ABI 7900 型定量 PCR 仪	美国应用生物系统公司	美国
纯水系统	默克密理博公司	美国
漩涡振荡器	江苏康健医疗用品有限公司	中国
流式细胞仪	贝克曼库尔特有限公司	美国

二、实验方法

(一) OFs 的培养、鉴定与保存

1、组织来源:

(1) TAO 患者眼眶脂肪结缔组织

来源于 2017 年 3 月至 4 月因甲状腺相关眼病就诊于我院眼科并行眼眶减压术的患者, 活动期患者 2 例 2 眼, 稳定期患者 3 例 3 眼, 均为女性患者, 年龄在 20 岁至 45 岁之间, 排除其他自身免疫性疾病。2 例活动期患者为视功能明显受损, 经连续 3 天大剂量激素冲击治疗 (甲基强的松龙 500mg+环磷酰胺 2g 静脉滴注), 视力改善不明显, 需急诊行眼眶减压手术挽救视力的患者。3 例稳定期患者为经过前期规律激素冲击治疗 (甲基强的松龙 500mg 静滴每周 1 次共 6 次, 甲基强的松龙 250mg 静滴每周 1 次共 6 次), 病情稳定 6 个月以上的患者, 但眼球仍明显突出, 眼睑闭合不全, 需行眼眶减压改善提高生活质量。

TAO 诊断主要依据 Bartly 诊断标准: (1) 患者存在眼睑退缩时: 只要合并以下一个体征或检查证据即可诊断: A. 甲状腺功能异常; B. 眼球突出: 突度大于或等于 16 mm; C. 视神经功能障碍, 包括视力下降, 瞳孔反射、色觉、视野异常, 排除其他疾病所致; D. 眼外肌受累: 表现为眼球活动受限、眼外肌增粗。(2) 患者无眼睑退缩时: 须具备甲状腺功能异常, 并有以下至少一个体征: A. 眼球突出; B. 眼外肌受累; C. 视神经功能障碍。(3) 以上两条均应排除其他眼病引起的类似体征。

患者病情活动性评估主要依据 CAS 评分标准: 1. 自发性球后疼痛; 2. 眼球转动时诱发疼痛; 3. 眼睑充血; 4. 结膜充血; 5. 泪阜或皱襞肿胀; 6. 眼睑肿胀; 7. 结膜水肿。存在以上一项临床表现记 1 分, 评分 ≥ 3 为活动期, 评分 < 3 为稳定期。

(2) 正常对照组患者眼眶脂肪结缔组织

来源于 2017 年 3 月至 2017 年 4 月就诊于我院眼科要求行眼眶减压改变外观的正常人，临床检查排除其他自身免疫性疾病，共 2 例 2 眼。

2、组织提取与转运

术前 2 小时内准备好 15ml 无菌离心管，装入约 5ml 无菌 DMEM 培养基，置于装有冰渣的泡沫保温箱中。手术台上于无菌环境取下眼眶脂肪结缔组织（尽量选取结缔组织较多的组织），放入事先准备好的离心管中，尽快（6 小时内）用冷藏保温箱运送至实验室细胞房。

3、细胞培养液和冻存液的配制

(1) 细胞培养液的配制

在超净台内，准备好 DMEM(dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基 500ml、四季青胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）100ml、青霉素-链霉素双抗 5ml。胎牛血清和双抗为冷冻保存，从冰箱取出后，放置于 37℃ 水浴锅中融解。胎牛血清可能含有杂质，可用过滤器过滤后使用。从 DMEM 培养基瓶中取出 100ml，剩余 400ml DMEM 溶液，往瓶中加入 100ml 四季青胎牛血清和 5ml 青霉素-链霉素双抗溶液，充分摇匀，得到含 20%FBS、1%双抗的 DMEM 完全培养基，将配制好的培养基放置于 4℃ 冰箱保存备用，并做好标记。

(2) 细胞冻存液的配制（使用前配制）

以配制 10ml 双倍冻存液为例，取一 15ml 离心管，先加入 DMEM 4ml 和胎牛血清 1ml，配制成 20%的培养液（不需要加双抗）。再取与培养液等体积即 5ml DMSO 溶液，逐滴加入到离心管中，即得到 20%DMSO 的双倍冻存液，置于室温下待用。

4、OFs 原代细胞培养：

提前半小时用紫外线消毒超净台及相关物品。在超净台内将取到的组织放入无菌培养皿中，用 PBS 缓冲液冲洗组织块 3 次，吸净冲洗液后向培养皿中加入 3ml DMEM 培养基，浸泡标本，以免组织块干燥失去活性。用眼科剪将组织块剪成约

1mm×1mm×1mm 小块, 尽量剪碎破坏组织间联系, 使细胞能从组织块中爬出)。用一次性无菌巴氏吸管将剪好的小块转移到 25 ml 细胞培养瓶中, 均匀地平铺在瓶底, 轻轻翻转培养瓶, 使瓶底朝上, 之后向瓶内加入含有 20% FBS 的 DMEM 培养液 3ml, 盖紧瓶盖。将培养瓶放入 37℃、体积分数为 5% CO₂ 孵箱内培养, 8~10 小时左右组织块稍微贴紧培养瓶壁时, 小心将培养瓶翻转, 使瓶底向下, 培养液浸泡组织块, 动作轻柔, 防止将组织块漂起, 继续放入 37℃、体积分数为 5% CO₂ 孵箱内培养。每天于倒置显微镜下观察培养瓶内细胞爬出情况, 根据培养瓶内的培养液的颜色及细胞生长速度更换培养液, 一般每隔 2~3 天换液一次。3~5 天即可在显微镜下观察到细胞从组织块周围爬出, 每日观察细胞生长状况、细胞形态等, 并做好记录, 2 周左右细胞融合基本铺满瓶底, 此时可进行细胞传代。

5、OFs 的传代培养

OFs 原代细胞在培养瓶中的密度达到 80% 左右时, 即可对其进行传代培养。步骤如下:

①用 3ml 巴氏吸管吸出培养瓶内旧培养液, 尽量吸除干净, 并用无菌 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 去除残余的血清。

②加入 EDTA-胰酶 1mL, 略盖过细胞即可, 室温放置 4~6 分钟。

③将培养瓶放置于倒置相差显微镜下观察, 如细胞收缩, 呈单个圆形时, 即可加入之前配好的完全培养基 2mL 终止消化。

④用巴氏吸管轻柔吹打瓶壁, 使贴壁细胞漂起成细胞悬液, 将细胞悬液吸入 15ml 无菌离心管中, 于离心机中以 1000rpm 离心 5 分钟。

⑤离心结束, 小心吸除上清液, 注意不要将管底的细胞吸走, 可剩余少量上清。

⑥向离心管中加入新的完全培养基, 轻柔吹打, 形成均匀细胞悬液, 将细胞悬液平均分到 2-3 个新培养瓶中, 静置后于倒置显微镜下观察, 轻晃培养瓶使细胞均匀分布, 置于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 孵箱内培养, 根据细胞生长情况, 每 2-3 天更换培养基 1 次, 3~5 天即可再次传代。

6、OFs 的计数、冻存与复苏

当原代细胞传至 2-3 代后, 细胞数量较多时, 可以将多余的细胞冻存, 以备后期

使用。

(1) OFs 细胞计数

①同细胞传代步骤①~⑤；

②向离心管中加入 2ml 完全培养基，轻柔吹打，形成均匀细胞悬液，用移液器取少量细胞悬液（约 100ul）进行细胞计数；

③用无水乙醇溶液擦拭计数板和盖玻片，静置待酒精完全挥发，将盖玻片覆在计数板上；

④从计数板边缘滴入一滴细胞悬液，液体沿计数板和盖玻片之间的间隙延展，铺满间隙（避免液体流入旁边的凹槽中或留有气泡），静置片刻，将计数板放在低倍显微镜下（10×10 倍）观察计数；

⑤计算计数板四角大方格内的细胞数，细胞碎片不计，细胞团按一个细胞计数，位于线上的细胞，按计下不计上，计左不计右的原则计数；

⑥每 ml 悬液细胞数=4 个大格细胞总数/4×10⁴。

(2) OFs 的冻存

①将计数后的细胞用不含双抗的培养基稀释至 2×10⁶cell/ml；

②取 1 个新的离心管，加入与细胞悬液等量的预先配好的双倍 20% 浓度冻存液，向冻存液中缓慢逐滴加入细胞悬液，并轻轻摇晃离心管，制成细胞冻存悬液（DMSO 终浓度为 10%，细胞终浓度为 1×10⁶cells/ml）；

③混合均匀后，用移液器分装至 1.8ml 冻存管中，每管约 1.5ml，冻存管上标记好细胞名称、代数、日期、冻存者等信息，严密封口，并取少量细胞悬液作污染检测；

④迅速将冻存管置于 4℃ 冰箱 10 分钟，-20℃ 冰箱 30 分钟，-80℃ 冰箱 24 小时进行序贯降温处理，而后转移至液氮罐中长期保存，以备后用。

(3) OFs 的复苏

①预热水浴锅至 37℃，从液氮罐中取出冻存管，立即放入水浴锅中融化；

②待冻存管中的液体完全融化后立即进行离心（1000 rpm，5 分钟）；

③离心完毕后，将上清吸除，加入新鲜培养基 1ml，用移液器轻柔吹打混匀；

④将混匀的细胞悬液转移入 25cm² 培养瓶中，并添加 4ml 完全培养基，十字混匀；

⑤在倒置显微镜下观察细胞状态及细胞密度，确认无误后，将培养瓶放入 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养，24 小时后换液。

7、OFs 的鉴定

(1) 形态观察

倒置显微镜下观察细胞由组织块边缘爬出的情况，观察细胞形态及传代后生长情况。

(2) 免疫组织化学鉴定

①取传至第三代的 OFs（此时细胞处于对数生长期），接种于预置盖玻片的 6 孔板中，约 1×10^5 cell/孔，十字混匀后，放置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养；

②定期观察细胞生长状况，待细胞铺满盖玻片约 50~60%时，取出 6 孔板，用无菌 PBS 缓冲液冲洗 5 分钟 ×3 次，清除培养液及代谢废物，风干；

③每孔加入 4%甲醛 2ml，静置 30 分钟，进行细胞固定，用无菌 PBS 缓冲液冲洗 5 分钟 ×3 次，风干，滴加无菌胎牛血清，放置于 37℃孵箱中孵育 15 分钟；

④用巴氏吸管吸除胎牛血清，不同孔中分别滴加小鼠抗人 Vimentin mAb、小鼠抗人 CKmAb、小鼠抗人 S-100 mAb、小鼠抗人 Desmin mAb，放置于 4℃冰箱孵育过夜；

⑤PBS 缓冲液冲洗 3 分钟，共 3 次，滴加生物素标记的羊抗小鼠 IgG，37℃孵育 20 分钟；

⑥PBS 缓冲液冲洗 3 分钟，共 3 次，滴加 SP 复合物，37℃孵育 20 分钟；

⑦PBS 缓冲液冲洗 3 分钟，共 3 次，DAB 显色剂显色，THB 洗 1 次，浸入底物溶液，暗置 10 分钟；

⑧自来水冲洗 5 分钟，苏木素复染，封片，显微镜照相观察。

(二) 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR) 测定 各组 OFs 中 TLR9 mRNA 表达水平

1、细胞准备

取 1 块六孔板，分成 3 组，每组各 2 孔，分别接种活动期 TAO 来源 OFs、稳定期 TAO 来源 OFs 以及正常对照组 OFs，按 1×10^5 cell/孔接种细胞，每孔加入完全培养基 2ml，将六孔板放入 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 2 天，细胞铺满约 80%左右，此时进行细胞总 RNA 的提取。

2、细胞总 RNA 的提取

本实验采用 Magen 公司提供的 RaPure Total RNA Micro Kit 试剂盒进行细胞总 RNA 的提取，具体步骤如下：

- ①分别收集各孔中的 OFs，用无菌 PBS 冲洗三遍，吸净 PBS；
- ②向六孔板每孔中加入适量的 RTL Lysis Buffer (350μl)，用移液枪反复吹打 (10 次) 使细胞从壁上脱落，将细胞悬液转移至 1.5ml 离心管中；
- ③用移液枪吹打裂解液 5~10 次，打断 DNA；
- ④加入等倍体积 (350μl) 的 RNA Binding Buffer(已加无水乙醇)至裂解液中，用移液枪吹打 5~6 次；
- ⑤把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移混合液至柱子中，12,000×g 离心 45 秒；
- ⑥倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RW1 至柱子中，12,000×g 离心 45 秒；
- ⑦倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000×g 离心 45 秒；
- ⑧倒弃滤液，把柱子装回收集管，12,000×g 离心 2 分钟；
- ⑨将柱子转移到 1.5ml 离心管，加入 30μl RNase Free Water 至柱子膜中央，室温静置 2 分钟，12,000×g 离心 1 分钟；
- ⑩弃去柱子，把 RNA 保存于 -80℃，备用；
- ⑪紫外吸收法测定 RNA 的浓度和纯度：先用无 RNA 酶的 dd H₂O 水将分光光度计调零。然后在检测孔滴入之前获得的总 RNA，仪器通过读取分光光度计的值自动计算得出 RNA 的浓度，同时通过测定 RNA 溶液的 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值，了解 RNA 溶液纯度，纯净 RNA 溶液 A₂₆₀/A₂₈₀ 应在 1.8-2.2 之间。

3、RNA 的逆转录

(1) RT 反应液的配制

本实验采用 Takara 公司提供的 PrimeScript™RT Master Mix(Perfect Real Time)试剂盒进行 RNA 逆转录。配制 RT 反应液时，采用试剂盒说明书中推荐的 20 μ l 反应体系进行，按下表所示组分进行 RT 反应液的配制，整个过程在冰块上操作：

试剂	所需体积 (μ l)
5 \times Prime Script Rt Master Mix (Perfect Real Time)	4
Total RNA	*
RNAase Free dH ₂ O	up to 20

*20 μ l 体系保证 RNA 的量不超过 1000 ng，根据前期测得的 RNA 浓度，调整加入 RNA 的体积，以使体系中最终 RNA 浓度相近（控制在 900-1000ng 之间）。

(2) 反转录成 cDNA

将装有反应液的 PCR 管盖紧管盖，在迷你离心机上离心 5 秒，轻柔摇匀反应液后，放入 PCR 热循环仪，按如下条件进行逆转录反应：

步骤	温度	时间
反转录反应	37 $^{\circ}$ C	15 min
反转录酶失活反应	85 $^{\circ}$ C	5 s
cDNA 的保存	4 $^{\circ}$ C	∞

4、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

本实验采用 Takara 公司提供的 SYBR Premix Ex Taq™II(Tli RNaseH Plus)试剂盒，采用 SYBR Green 荧光染料掺入法进行 qRT-PCR。其实验原理为：将过量的 SYBR 荧光染料加入到 PCR 反应体系中，该荧光染料会随 PCR 反应的进行，特异性地掺入到 DNA 双链中，掺入到 DNA 中的染料分子可发射荧光信号，而未掺入的荧光染料分子则不会发射荧光信号。因此，可根据荧光信号的强弱程度判断 PCR 反应的产物量。而管家基因在细胞中的表达是相对稳定的，根据目的基因与管家基因 PCR 反应产物量的比值，可反映目的基因初始 RNA 相对于管家基因 RNA 的表达水平，从而实现半定量检测。

(1) 引物的设计与合成

根据 NCBI 已报道的基因序列, 用 Primer Premier 6.0 软件设计特异性的引物, 引物序列见下表, 引物设计完成后交由上海生工生物技术公司合成, 所有引物均采用 PAGE 纯化。

本实验所用引物如下:

名称	引物序列
TLR9	上游 5'-CCTGAGCCACAACCTGCATCT-3'
	下游 5'-CGTGAATGAGTGCTCGTGGT-3'
IL-6	上游 5'-TGAGGAGACTTGCCTGGTGA-3'
	下游 5'-ATCTGCACAGCTCTGGCTTG -3'
TNF- α	上游 5'-CAATGGCGTGGAGCTGAGAG-3'
	下游 5'-GTCTGGTAGGAGACGGCGAT-3'
ICAM-1	上游 5'-TAGAGCCAAGGTGACGCTGA-3'
	下游 5'-TTGCAGAGCAGGAGAAGCTG-3'
IFN- γ	上游 5'-GTGGAGACCATCAAGGAAGACA-3'
	下游 5'-GCGACAGTTCAGCCATCACT-3'
GAPDH(内参基因)	上游 5'-AGATCATCAGCAATGCCTCCTG-3'
	下游 5'-ATGGCATGGACTGTGGTCATG -3'

获得的引物为粉末状, 先用离心机 3000rpm 离心 1 分钟, 使引物沉淀于离心管底部, 根据引物说明加入适量的 DEPC 水配制成浓度为 10 μ M 的引物溶液, 放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

(2) PCR 反应体系配制

试剂	体积
SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus) (2 \times)	10 μ l
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.8 μ l
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.8 μ l
ROX Reference Dye or Dye II (50 \times)	0.4 μ l
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μ l
灭菌水	6 μ l

(3) 加样

- ①根据实验设计，每组样本每个基因均设置 3 个复孔，减小操作导致的误差；
- ②由于 SYBR Premix Ex Taq II 中含有荧光染料，遇光后容易分解，因此加样时避免强光照射，将 SYBR Premix Ex Taq II 试剂放在最后加样；
- ③Premix 和灭菌水可合并取样混合后分装入 PCR 板各加样孔，为了保证 Premix 和灭菌水的量足够一般多配 2~3 个孔的量；
- ④为了简化加样程序，实验前将上游引物和下游引物等比例混合，则每孔共需 1.6 μ l 引物混合液；
- ⑤加样过程尽量缩短时间，避免荧光染料的分解。

(4) PCR 反应

全部加样完毕后，贴紧 PCR 膜，避免划痕，上机检测，PCR 反应条件采用试剂盒推荐的两步法 PCR 程序。

步骤如下：

第一步：预变性

95 $^{\circ}$ C 30 秒

循环数：1

第二步：PCR 反应

95 $^{\circ}$ C 5 秒

60 $^{\circ}$ C 34 秒

循环数：40

(5) 数据读取与分析

反应完成后，机器自动根据获取的荧光信号，获得 PCR 扩增曲线，读取循环数（Ct 值）。采用公式 $\Delta Ct = [Ct(\text{目的基因})] - [Ct(\text{内参基因})]$ ， $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct(\text{实验组})] - [\Delta Ct(\text{对照组})]$ ，计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，即为实验组目的基因表达量相对于对照组的倍数。

(三) CCK8 法测定 CpG-ODN 激活 TLR9 后细胞增殖情况

1、CCK8 法测定细胞增殖的原理

CCK8 全称 Cell Counting Kit-8 试剂, 可用于简便而准确的细胞增殖和毒性分析。其基本原理为: 该试剂中的 WST-8[2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐], 在电子载体 1-Methoxy PMS (1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯) 的作用下被活细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲瓚产物 (Formazan dye), 可直接用酶联免疫分析仪检测吸光度, 因此可通过测定样本的 OD 值, 测定甲瓚产物的数量, 间接反映细胞活性。

2、细胞准备

细胞培养方法同上, 取活动期 TAO 组、稳定期 TAO 组、正常对照组 OFs, 消化离心后, 进行细胞计数, 加入适量的培养液混匀, 将细胞浓度调整至约 5×10^4 cell/ml, 轻柔混匀。

3、验证 CpG-ODN 促进 OFs 增殖的时间效应

取 4 块 96 孔板, 向 96 孔板周边各孔加入 100 μ l 无菌 PBS 缓冲液; 中间的 60 个孔分成 3 组, 分别活动期 TAO、稳定期 TAO 及正常对照组; 各组取 18 孔分为 3 个亚组 (各 6 孔), 分别标记为加药组、0 加药组和空白组, 向加药组和 0 加药组中分别加入 100 μ l 对应细胞悬液, 空白组中加入 100 μ l 无菌培养基, 剩余孔均加入 100 μ l 无菌 PBS 缓冲液。如此重复加样 4 板, 作为 CpG-ODN 不同作用时间的样板, 放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中培养 24 小时。24 小时后取出 96 孔板, 于各板 18 个加药组孔中加入 CpG-ODN (终浓度为 200nM), 其余孔不做处理, 继续放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中培养, 分别于 24h、48h、72h 取一板进行 CCK8 实验, 测定 OD 值。

4、验证 CpG-ODN 促进 OFs 增殖的剂量效应

取 1 块 96 孔板, 向 96 孔板周边各孔加入 100 μ l 无菌 PBS 缓冲液; 取中间 36 孔, 分 6 组, 按最终添加 CpG-ODN 浓度分为 200nM 组、400nM 组、600nM 组、800nM 组、0 加药组和空白细胞组, 每组 6 个复孔, 空白细胞组加入 100 μ l 无菌培养基, 其余各组均加入 100 μ l 活动期 TAO 组 OFs 细胞悬液, 剩余各孔添加 100 μ l 无菌 PBS 缓冲液。用相同方法进行稳定期 TAO 组 OFs、正常对照组 OFs 细胞悬液铺板。将 3 块

96 孔板放入 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养，24 小时后取出，向对应加药孔中添加 CpG-ODN 溶液，继续放入 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 72h 后，进行 CCK8 实验，测定 OD 值。

5、CCK8 法测定细胞活力

用移液器缓慢向每孔中加入 10μl CCK 溶液（避免产生气泡，否则会影响读取的 OD 值数值），将培养板再放入 37℃、5%CO₂ 孵箱中孵育 2 小时后取出，用酶标仪测定各孔在 450nm 处的吸光度，存储好数据，拷贝至电脑中进行细胞活力分析。

6、细胞活力计算

细胞活力代表各组细胞增殖能力的强弱，根据以下公式计算细胞活力：

$$\text{细胞活力 (\%)} = \frac{[A(\text{加药}) - A(\text{空白})]}{[A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})]} \times 100$$

A（加药）：具有细胞、CCK 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A（空白）：具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A（0 加药）：具有细胞、CCK 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

（四）qRT-PCR 检测各组细胞用 CpG-ODN 激活 TLR9 后不同时间点炎症因子 IL-6、TNF-α、ICAM-1、IFN-γ mRNA 表达水平

1、实验目的

本实验设计为三组细胞分别经 CpG-ODN 作用后于 0h、6h、12h、24h 四个时间点分别收集细胞，提取 RNA，经逆转录生成 cDNA，进行 qRT-PCR 实验测定 IL-6、TNF-α、ICAM-1、IFN-γ mRNA 表达水平，验证 TLR9 表达差异与炎症因子 IL-6、TNF-α、ICAM-1、IFN-γ 表达水平变化之间的联系。

2、细胞分组

取 4 块六孔板，分别为 0h、6h、12h、24h 四个分组，每板 6 孔分为三组，分别接种活动期 TAO 来源 OFs、稳定期 TAO 来源 OFs 和正常对照 OFs，各组 2 个复孔。各孔中分别加入对应细胞 1×10^5 cell 和完全培养基 2ml，做好标记，放入 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 24 小时，使细胞贴壁。

3、往细胞培养基中加入 CpG-ODN 激活 TLR9

各组细胞经 24h 培养后，细胞均贴壁生长良好。向 6h、12h、24h 组各孔中分别加入 4 μ l CpG-ODN 溶液，使 CpG-ODN 终浓度为 200nM（根据细胞活力实验结果显示浓度为 200nM 时细胞增殖力最强）。0h 组即为 CpG-ODN 刺激前的对照组，不需加入 CpG-ODN。根据各组设计的时间点，收集各孔细胞，按前面所述方法进行 qRT-PCR 实验检测 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ mRNA 表达水平。

(五)siRNA 下调 TLR9 mRNA 表达水平后,再次用 CpG-ODN 刺激各组细胞, qRT-PCR 检测 IL-6、TNF- α 、ICAM-1 mRNA 表达水平

本实验采用常州百代生物公司提供的 RFect 小核酸转染试剂作为转染载体进行 siRNA 的转染。RFect 是一种新型的小核酸转染试剂，采用新型的动物源性的纳米材料，毒性低，转染性能很高，可用来转染 microRNA、siRNA、antisense RNA 等长度小于 200bp 的小分子 RNA 和 DNA，适用于大多数贴壁细胞的转染。整个转染过程不可添加抗生素，因其会导致细胞死亡。

本实验采用的 TLR9-siRNA 由吉玛基因生物公司设计合成，共提供 3 条 siRNA、1 条阴性对照 siRNA 及 1 条带 FAM 荧光标记的 siRNA，序列如下：

siRNA 序号	序列
siRNA1	上游 5'-GACGGCAACUGUUAUACATT-3' 下游 5'-UGUAAUACAGUUGCCGUUCTT-3'
siRNA2	上游 5'-GCCAUACCAACAUCUGAUTT-3' 下游 5'-AUCAGGAUGUUGGUAUGGCTT-3'
siRNA3	上游 5'-CCUGCAAUACUAGAUGUATT-3' 下游 5'-UACAUCUAGUUAUUGCAGGTT-3'
阴性对照 siRNA	上游 5'-UUUCUUUCGAACGUGUCACG-3' 下游 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
带 FAM 荧光标记的阴性对照 siRNA	上游 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 下游 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

1、siRNA 转染效率测定

为了选择转染效率最高的 siRNA 序列，选取活动期 TAO 来源的 OFs，按六孔板每孔 5×10^4 cell 进行细胞培养 24h 后，分别用上述 3 个 siRNA 进行转染，12h 后对三组细胞分别作 qRT-PCR 实验测定 TLR9 mRNA 表达情况，结果显示 siRNA1 转染效率最高，因此后续实验选用 siRNA1 进行。

为了选取 siRNA 转染的最佳浓度，选取活动期 TAO 来源的 OFs，按六孔板每孔 5×10^4 cell 进行细胞培养 24h 后，分成 5 组，分别按终浓度为 0nM、20nM、40nM、60nM、80nM 加入带 FAM 荧光标记的阴性对照 siRNA 和 10 μ l Rfect，放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱内培养 6 小时后，在荧光显微镜下观察各组细胞内荧光信号强弱，结果显示 40nM 组荧光信号最强，因此后续实验均以 siRNA 终浓度为 40nM 进行。

2、细胞准备

按前述方法培养细胞，取活动期 TAO 组（TLR9 高表达）对数生长期细胞，用含 20% 胎牛血清但不含双抗的 DMEM 培养液将细胞浓度稀释成 2×10^4 cell/ml。按 siRNA 作用后时间分为 0h、12h、24h、36h 四组，每组各 2 孔，做好标记。转染前一天接种细胞，每孔中加入相应组别细胞悬液 2500 μ l，使细胞在转染时密度在 30-50%。

3、siRNA-Rfect 混合物准备

根据 Rfect 小核酸转染试剂说明书推荐的配制方法进行操作（按六孔板每孔剂量）：

- (1) 120pmol siRNA 用 250 μ l DMEM 培养基（不含血清和双抗）稀释；
- (2) 10 μ l Rfect 用 250 μ l DMEM 培养基（不含血清和双抗）稀释。轻柔混匀，室温条件下孵育 5min；（确保在 25 min 内进行第三步操作，不要过于推迟）
- (3) 孵育 5min 后，将 Rfect 稀释液与 siRNA 稀释液混合（总体积 500 μ l），轻柔混匀，室温条件下孵育 20 min。

实际配制时，根据实验设计需要对 12h、24h、36h 三组进行 TLR9-siRNA 转染，共有 18 孔需要加样，因此按上述剂量的 20 倍体积进行配制（为了保证试剂量足够，多配两个孔的量）。

4、向各孔加入 siRNA-RFect 混合物和 CpG-ODN

(1) 向 12h、24h、36h 三组六孔板各孔中加入 500 μ l siRNA-RFect 混合物，此时每孔内含有 3000 μ l 混合培养液，向 0h 组六孔板各孔中加入 500 μ l DMEM 培养基（不含血清和双抗），消除加样误差；

(2) 分别于对应时间（0h、12h、24h、36h）向各孔中分别加入 6 μ l CpG-ODN 溶液，使其最终浓度为 200nM，激活 TLR9；

(3) 轻轻晃动培养板，使试剂与细胞均匀分布，放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱内培养 6h 后取出对应六孔板，提取 RNA 进行 qRT-PCR 实验，检测 TLR9、IL-6、ICAM-1、IFN- γ mRNA 表达水平，观察 TLR9 与相关炎症因子之间的相关性。

（六）统计学方法

本实验中的数据均为剂量资料，以 $X \pm s$ 表示，采用 SPSS19.0 软件对各组进行单因素方差分析，应用 Dunnett t 进行两组数据资料之间的差异分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

实验结果

一、OFs 细胞的培养

分别从活动期 TAO 患者、稳定期 TAO 患者及排除自身免疫疾病行眼眶减压手术改善外观的正常人中获取脂肪结缔组织，采用组织块培养法分离纯化。各组均分离出 OFs，且 OFs 在体外均较易生长，各组细胞形态区别不明显。

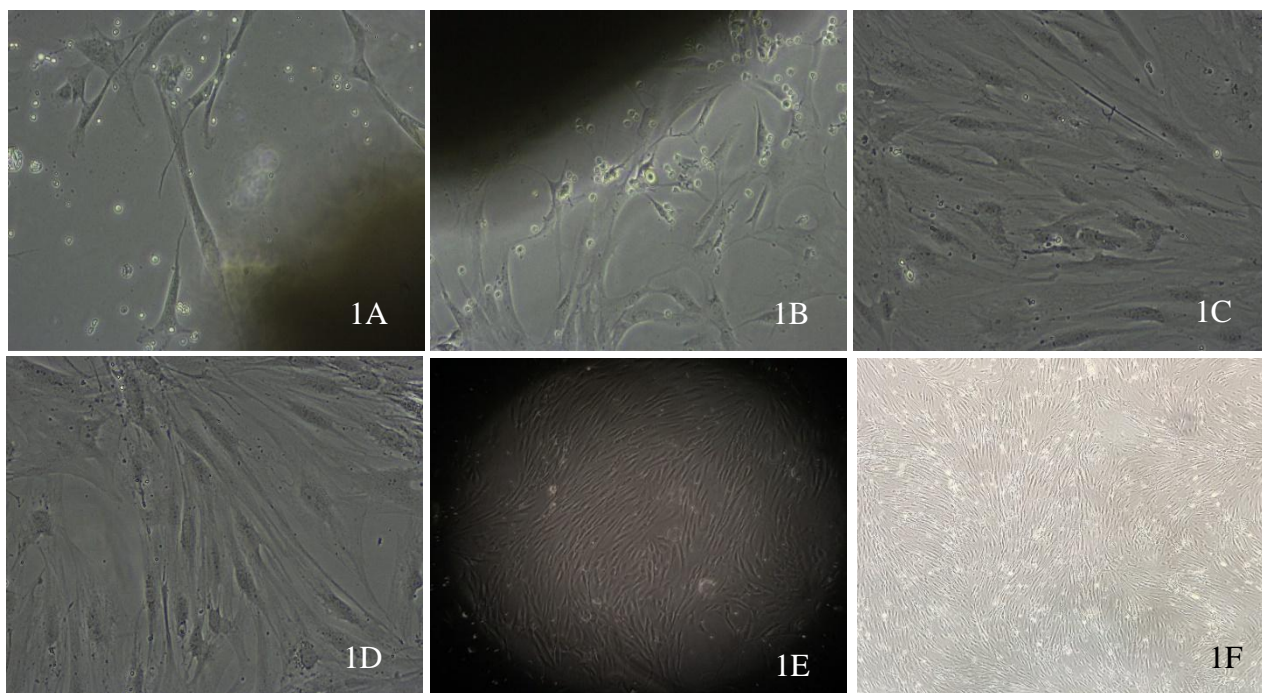


图 1.各组细胞形态图：1A.活动期 TAO 来源组织块培养 5 天；图 1B.正常对照组组织块培养 7 天；图 1C.活动期 TAO 来源组织块培养 9 天；图 1D.稳定期 TAO 来源组织块培养 10 天；图 1E.稳定期 TAO 来源组织块培养 12 天；图 1F.活动期 TAO 来源组织块培养 14 天

在接种 3~5 天，即可见少量细胞从组织块周围有爬出，呈细长梭形，有的相互连接成网状（图 1A、1B）。7~9d 后细胞大量游出，呈典型的梭形，胞体较丰满（图 1C、1D）。约 2 周左右细胞融合基本铺满瓶底，部分相互重叠，此时可进行首次传代(1E、1F)。传代后细胞生长较快，1 周左右即可再次传代，经反复换液和传代后，即可得到相对纯净、生物学性状稳定的细胞。

各组细胞传至第三代时，取部分细胞进行六孔板铺板，细胞铺满盖玻片约 50~60% 时，进行免疫组织化学鉴定。结果显示各组细胞 Vimentin 染色均呈阳性，阳性棕色反应产物均匀分布于胞质中(图 4A)；而 Desmin（图 2B），S-100（图 2C），CK（图

2D) 染色均呈阴性, 证明细胞为中胚层来源细胞, 鉴定为成纤维细胞。

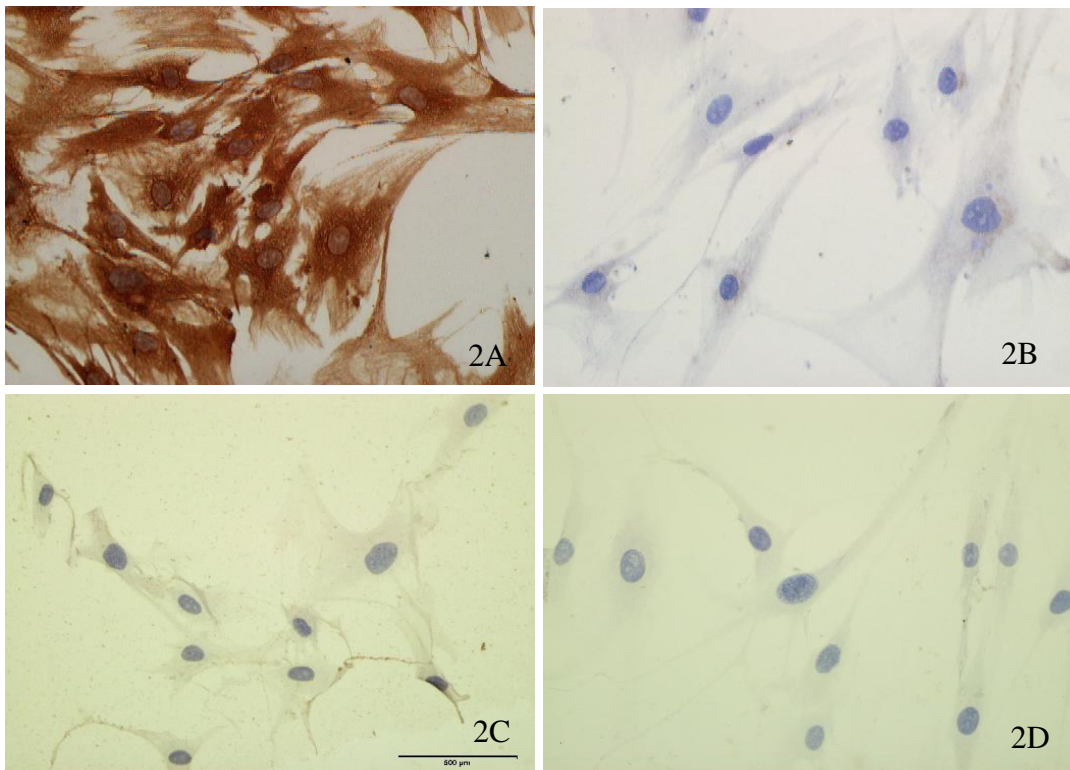


图 2. 细胞鉴定结果, A. Vimentin 染色 (+) ($\times 400$), B. CK 染色 (-) ($\times 400$), C. Desmin 染色 (-) ($\times 400$), D. S-100 染色 (-) ($\times 400$)

二、实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR) 测定各组 OFs 中 TLR9 mRNA 表达水平

将处于对数生长期的活动期 TAO 组、稳定期 TAO 组和正常对照组 OFs, 接种于六孔板中, 于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱中培养 2 天, 收集细胞提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 进行 qRT-PCR 实验, 每组进行 3 次重复, 获得 TLR9 和 GAPDH 扩增曲线及 Ct 值, 计算得出 TLR9 mRNA 相对表达量。结果显示: 活动期 TAO 组 OFs TLR9 mRNA 表达水平明显高于正常对照组, 差异有统计学意义, $P < 0.001$; 而稳定期 TAO 组 OFs TLR9 mRNA 的表达水平则较正常对照组下降, 差异均有统计学意义, $P < 0.01$ 。详见表 1。

表 1 不同组 OFs TLR9 mRNA 相对表达水平

活动期 TAO	稳定期 TAO 组	正常对照组	F 值	P 值
2.37±0.13	0.68±0.04	1.00±0.05	343.610	<0.001

*p<0.05, 三组的 CT 值均数差异有统计学意义, 说明三组的总体均数不全相同。接下来以正常对照组为对照, 采用 Dunnett t 进行两两比较。

项目	均值差	标准误	P 值
活动期 TAO 组 VS 正常对照组	1.374130	.068665	.000
稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	-.319874	.068665	.006

注: 以正常对照组为参照, 活动期 TAO 组 TLR9 mRNA 表达水平明显高于正常对照组, 差异有统计学意义, P<0.001; 稳定期 TAO 组 TLR9 mRNA 表达水平较正常对照组下降, 差异有统计学意义, P<0.01。

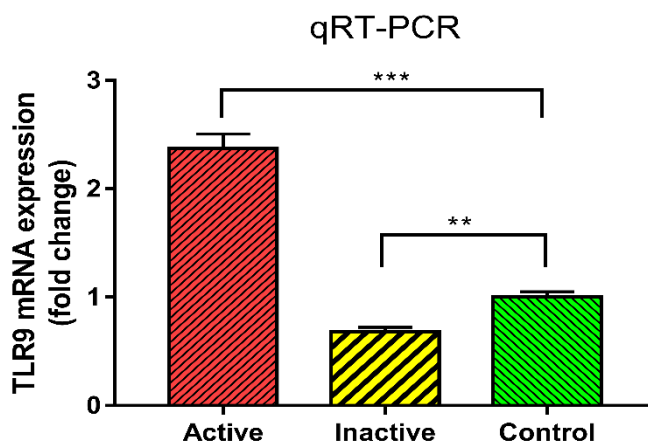


图 3.三组 OFsTLR9 mRNA 相对表达水平

三、CpG-ODN 激活 TLR9 后, OFs 增殖活力的变化

(一)、时间效应

取各组对数生长期的细胞, 消化后, 按 5×10^3 cell/孔接种于 96 孔板中, 放置于 37°C、5%CO₂ 孵箱培育 24 小时。待细胞贴壁生长后, 按 CpG-ODN 终浓度为 200nM 对试验孔进行干预, 分别于 0h、24h、48h、72h 进行 CCK8 实验, 测定各孔 OD 值 (剔除 OD 值数据中偏差较大的数据), 计算各组细胞活力, 采用单因素方差分析和 T

检验进行统计分析。结果显示：CpG-ODN 刺激活动期 TAO 组 OFs 后，细胞活力随时间推移呈逐步上升趋势，以 0h 细胞活力为对照，48h、72h 细胞活力升高，差异有统计学意义， $P < 0.05$ ；而 CpG-ODN 刺激稳定期 TAO 组、正常对照组 OFs 后，细胞活力变化幅度不大，各组差异均无统计学意义， $P > 0.05$ 。

表 2. CpG-ODN (200nM) 刺激后各组细胞活力随时间变化情况

时间点	活动期 TAO 组	稳定期 TAO 组	正常对照组	F 值	P 值
0h	1.023 ± 0.068	0.985 ± 0.010	0.998 ± 0.016	0.673	0.545
24h	1.062 ± 0.087	1.038 ± 0.020	1.085 ± 0.045	0.509	0.625
48h	1.245 ± 0.075	0.958 ± 0.059	1.084 ± 0.04	117.248	0.03
72h	1.282 ± 0.059	0.953 ± 0.022	1.042 ± 0.023	58.024	0.000
前后变化值					
0h-24h	-0.39 ± 0.063	-0.053 ± 0.030	-0.087 ± 0.041	.857	.470
0h-48h	-0.222 ± 0.089	0.027 ± 0.058	-0.086 ± 0.037	11.096	.010
0h-72h	-0.259 ± 0.105	0.031 ± 0.031	-0.042 ± 0.020	16.478	.004

各组行单因素方差分析，0h、24h 组 $P > 0.05$ ，说明这两个时间点三组间差异无统计学意义；48h、72h 组 $P < 0.05$ ，说明这两个时间点三组间差异有统计学意义，均值不全相等。进一步以正常对照组为参照，对有统计学意义的两个时间点数据采用 T 检验进行两两比较：

时间点	项目	均值差	标准误	P 值
48h	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	.160910*	.048984	.029
	稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	-.126082	.048984	.073
72h	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	.240337*	.031576	.000
	稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	-.088302	.031576	.054
0-48h	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	-.136048	.052890	.073
	稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	.112742	.052890	.131
0-72h	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	-.215476*	.052530	.011

稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	.074962	.052530	.327
--------------------	---------	---------	------

均值差的显著性水平为 0.05，在 48h、72h 时，活动期 TAO 组与正常对照组间差异有统计学意义， $P < 0.05$ ；而稳定期 TAO 组与正常对照组间差异无统计学意义， $P > 0.05$ 。

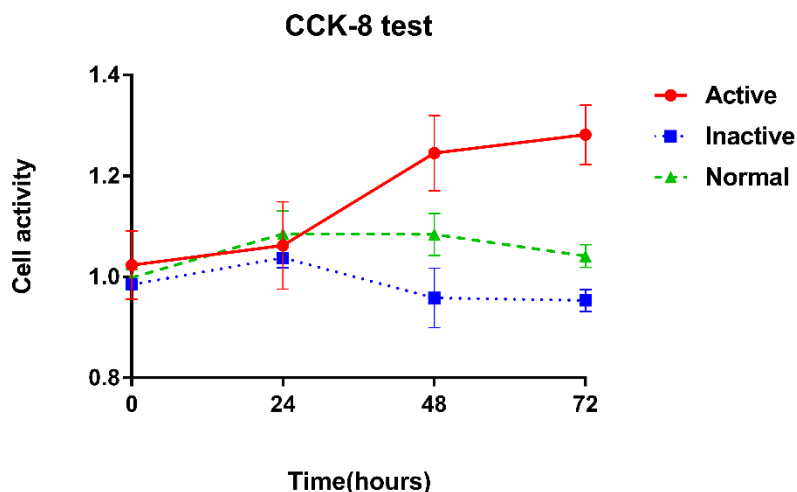


图 4.CpG-ODN (200nM) 刺激后各组细胞活力时间曲线

(二)、剂量效应

取各组对数生长期的细胞，消化后，按 5×10^3 cell/孔接种于 96 孔板中，放置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱培育 24 小时，待细胞贴壁生长后，分别给予不同浓度 CpG-ODN 刺激，72 小时后进行 CCK8 实验，测定各孔 OD 值（剔除每组数据中偏差较大的数值），计算各组细胞活力，采用单因素方差分析和 T 检验进行统计分析。结果显示：各组细胞经 CpG-ODN 刺激后，细胞活力在 200nM 时最高，而后随 CpG-ODN 浓度升高逐渐下降，600nM 时细胞活力抑制最明显，800nM 时细胞活力回升，差异有统计学意义， $P < 0.01$ 。以正常对照组为参照，活动期 TAO 组细胞活力在各浓度时均明显升高，在 200nM、400nM、600nM、800nM 时，差异均有统计学意义， $P < 0.05$ ；稳定期 TAO 组则较正常对照组下降，但不明显，在 400nM、800nM 时，差异有统计学意义， $P < 0.05$ 。

表 3.不同浓度 CpG-ODN 刺激后各组细胞活力比较

CpG-ODN 浓度	活动期 TAO 组	稳定期 TAO 组	正常对照组	F 值	P 值
0nM	1.023±0.068	0.985±0.010	0.998±0.164	.673	0.545
200nM	1.286±0.075	0.953±0.022	1.041±0.023	40.006	.000
400nM	1.194±0.040	0.871±0.007	0.969±0.032	93.383	.000
600nM	1.138±0.104	0.850±0.048	0.906±0.067	11.920	.008
800nM	1.278±0.029	0.877±0.024	1.010±0.046	105.320	.000

各组间比较,除 CpG-ODN 浓度为 0nM 外,其他各浓度三组间差异均有统计学意义,进一步进行两两比较(多重 T 检验):

CpG-ODN 浓度	项目	均值差	标准误	P 值
200nM	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	.244324*	.038525	.001
	稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	-.088302	.038525	.105
400nM	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	.225813*	.024250	.000
	稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	-.097162*	.024250	.013
600nM	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	.231657*	.062512	.018
	稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	-.056284	.062512	.597
800nM	活动期 TAO 组 VS 正常对照组	.267368*	.028137	.000
	稳定期 TAO 组 VS 正常对照组	-.133635*	.028137	.006

均值差的显著性水平为 0.05

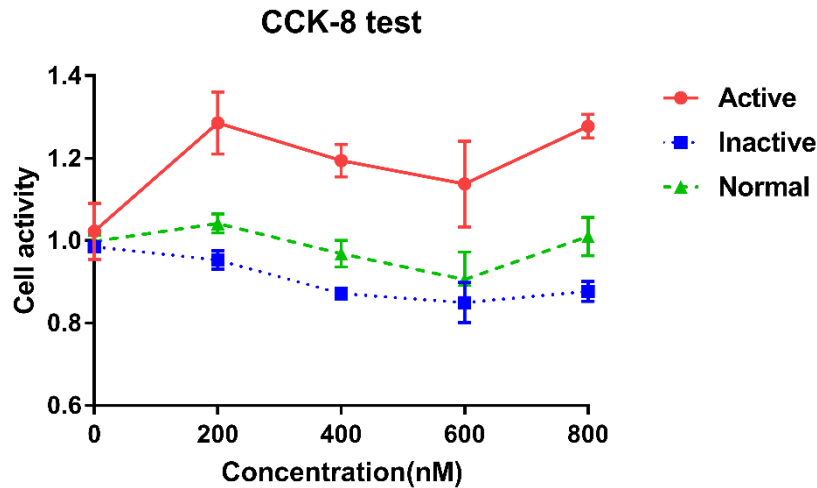


图 5. CpG-ODN 刺激 72h 后各组细胞活力浓度曲线

四、CpG-ODN 刺激 OFs 后炎症因子 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ mRNA 表达水平变化

各组 OFs 经浓度为 200nM 的 CpG-ODN 刺激后，分别于 0h、6h、12h、24h 收集细胞，提取总 RNA，逆转录成 cDNA，行 qRT-PCR 实验，测定 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ mRNA 相对表达水平。结果显示：与正常对照组相比，在 CpG-ODN 刺激后 6h，活动期 TAO 组 IL-6、ICAM-1、IFN- γ mRNA 相对表达水平均明显上调，差异有统计学意义， $P < 0.001$ ；TNF- α mRNA 相对表达水平轻度上调，差异有统计学意义， $P < 0.05$ ；稳定期 TAO 组 IL-6 表达水平上调，TNF- α 、IFN- γ mRNA 相对表达水平下调，差异有统计学意义， $P < 0.01$ 。CpG-ODN 刺激 12h、24h，各组细胞 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ mRNA 相对表达水平较基线水平均显著下调，差异有统计学意义， $P < 0.05$ 。

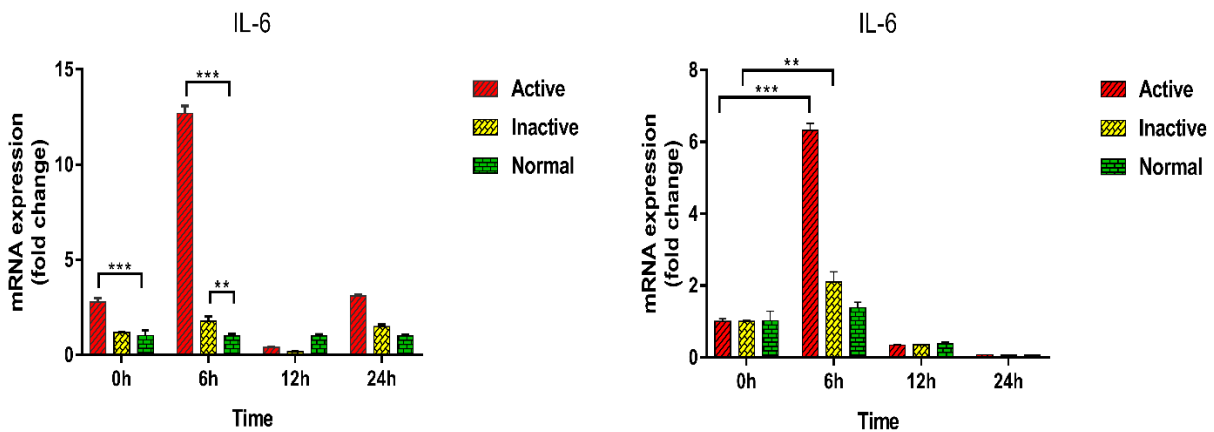


图 6. 各组细胞经 CpG-ODN 刺激后 IL-6 mRNA 相对表达水平

各组 IL-6 mRNA 相对表达水平, 在 6h 均明显高于基线水平, 12h、24h 显著低于基线水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 活动期 TAO 组与正常对照组、稳定期 TAO 组与正常对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

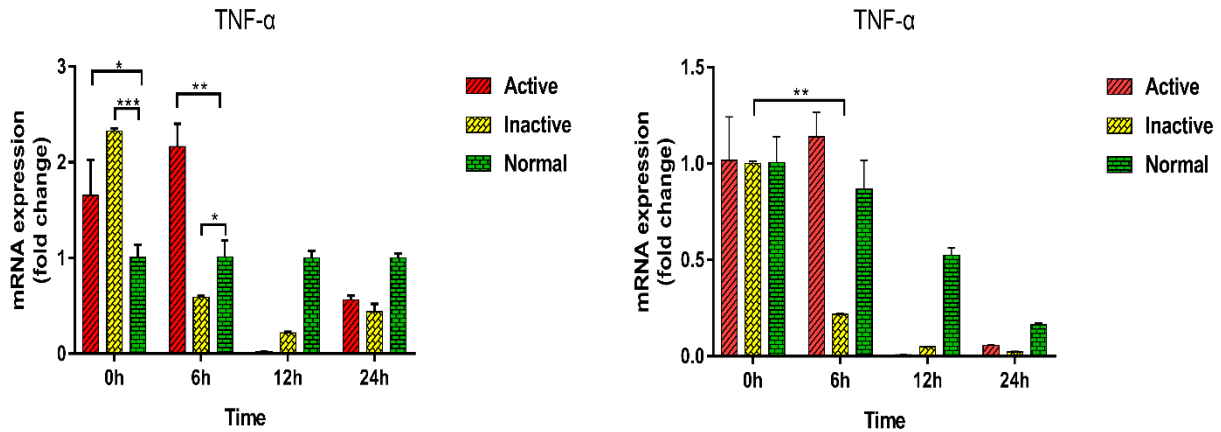


图 7. 各组细胞经 CpG-ODN 刺激后 TNF- α mRNA 相对表达水平

活动期 TAO 组 TNF- α mRNA 相对表达水平在 6h 时上调, 但幅度不大, 12h、24h 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 稳定期 TAO 组和正常对照组 TNF- α mRNA 相对表达水平在各时间点均显著降低, 稳定期下降更明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与正常对照组相比, 6h 时活动期 TAO 组相对高表达, 稳定期 TAO 组相对低表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

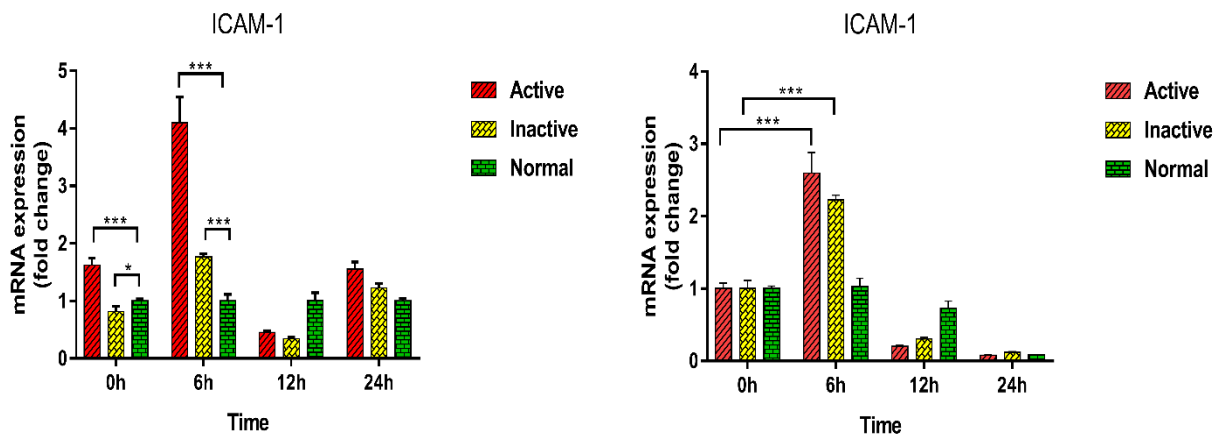


图 8. 各组细胞经 CpG-ODN 刺激后 ICAM-1 mRNA 相对表达水平

活动期 TAO 组与稳定期 TAO 组 ICAM-1 mRNA 表达水平在 CpG-ODN 刺激 6h 时显著高于基线水平, 12h、24h 显著低于基线水平, 且活动期组升高幅度较稳定期组明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 而正常对照组表达水平早期波动不大, 仅在 24h 时差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与正常对照组相比, 6h 时活动期 TAO 组、稳定期 TAO 组相对表达水平显著高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

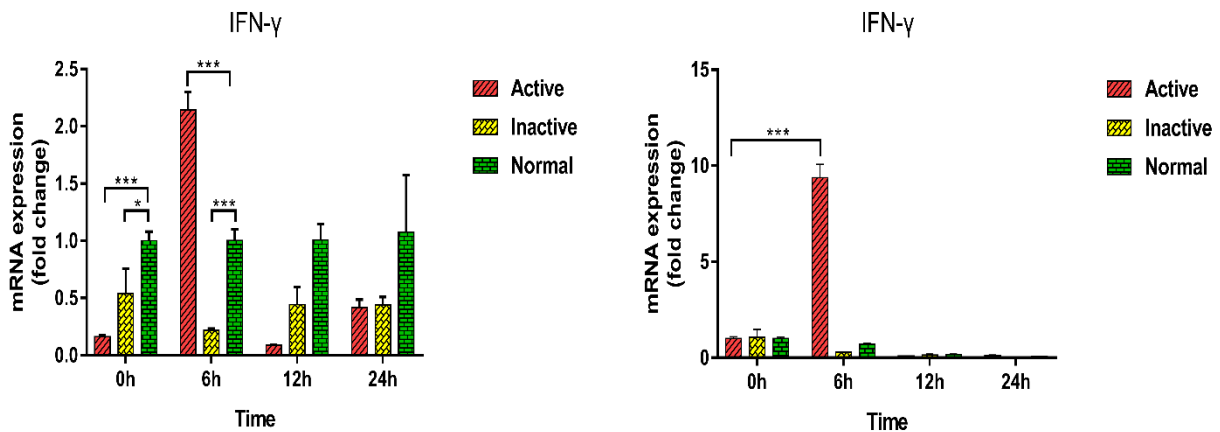


图 9. 各组细胞经 CpG-ODN 刺激后 IFN- γ mRNA 相对表达水平

活动期 TAO 组 IFN- γ mRNA 相对表达水平在 CpG-ODN 刺激 6h 时显著高于基线水平, 12h、24h 时显著低于基线水平, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$); 稳定期 TAO 组和正常对照组在各时间点均明显降低, 稳定期 TAO 组与正常对照组的差异在 6h 时有统计学意义 ($P < 0.001$), 在 12h、24h 时无统计学意义 ($P > 0.05$); 与正常对照组相比, 6h 时活动期 TAO 组显著高表达, 稳定期 TAO 组表达显著下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

五、TLR9 mRNA 表达水平下调后, 再用 CpG-ODN 刺激 OFs, qRT-PCR 检测 IL-6、ICAM-1、IFN- γ mRNA 表达水平

将 siRNA 转染入活动期 TAO 组 OFs 作为实验组, 以阴性对照 siRNA 转染活动期 TAO 组 OFs 作为对照组, 同时用 CpG-ODN 刺激。以对照组各基因 mRNA 表达量

为 1 进行比较, 与对照组相比, 转染了 siRNA 的活动期 TAO 组, TLR9 mRNA 在 24h 时表达水平降至最低, IL-6、ICAM-1、IFN- γ mRNA 表达水平也表现为相同的变化趋势, 与 TLR9 表达水平呈正相关。

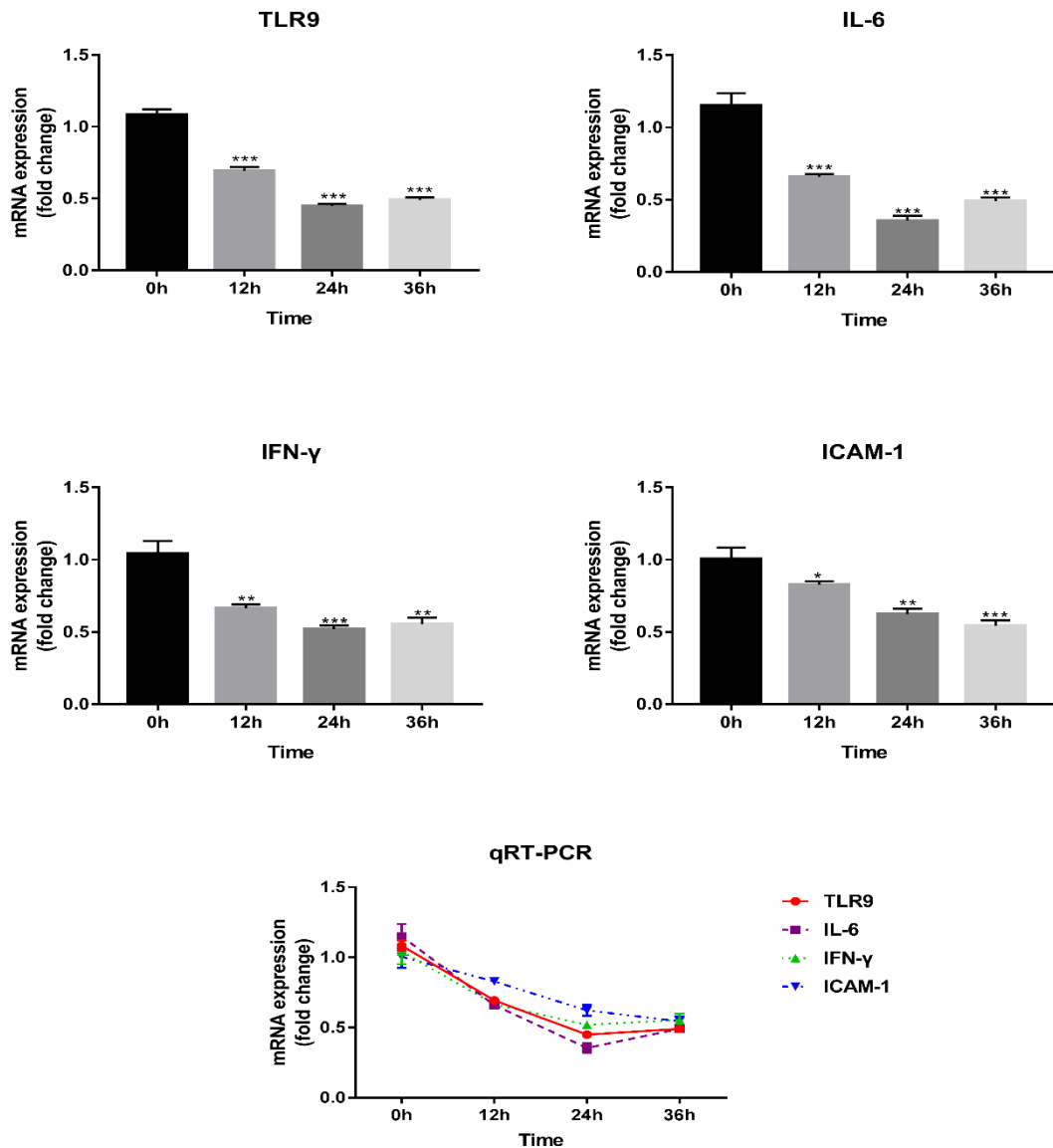


图 10. siRNA 下调活动期 TAO 组细胞 TLR9 表达水平后各炎症因子表达情况

TLR9 mRNA 在 siRNA 干扰 24h 时表达水平降至最低, 差异有统计学意义, $P < 0.05$; IL-6、IFN- γ mRNA 表达水平同样在干扰后 24h 时降至最低水平, ICAM-1 mRNA 表达水平在 36h 内呈持续下降趋势, 各时间点与 0h 相比, 差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。

讨 论

目前研究认为 TAO 是一种自身免疫性疾病,是 Graves 病最常见的甲状腺外表现,近年来其发病呈上升趋势,女性患者相对多见。其临床表现可复杂多样,大多数患者病情较轻,仅表现为轻度眼球突出、眼睑退缩,往往患者自己尚未注意到疾病的发生,已经进入稳定期。而临床上就诊的大部分 TAO 患者,常因眼球突出、眼睑退缩、眼睑及结膜充血水肿、复视等就诊,部分严重病例可因严重眼球突出导致角膜暴露,形成角膜溃疡,或者由于眼眶容积增加,而不能自行减压,导致眶腔拥挤,压迫视神经,导致视力下降,甚至失明。这些对患者的生活质量产生了很大的负面影响,同时由于外观的改变,会对患者心理造成巨大影响,无论对患者自身还是其家人和社会都会带来沉重的负担。但由于目前该病的病理机制尚不明确,目前医学界普遍认为其是一种自身免疫性疾病,活动期患者治疗上通常采用激素、免疫抑制剂以及放射治疗,稳定期患者通常需要通过眼眶减压术、眼睑退缩矫正术、复视矫正术等纠正解剖异常。虽然这些治疗方法,可以从一定程度上控制病情,缓解不适症状,恢复患者容貌,但都是对症治疗的措施,治疗中也难免会带来一些不良并发症。因此,研究 TAO 的病理机制成为近年来眼科和内分泌学界的热点,尽快明确其发病机制,也是临床治疗的迫切需求。

随着近年来关于 TAO 及 Graves 病等研究的深入,我们对该病也有了进一步的认识。目前多数学者认为 OFs 在 TAO 的发病过程中起到了重要作用。关于 OFs 的研究发现:这类细胞可表达共刺激分子和各种细胞因子和生长因子的细胞表面受体^[21],它们可对特定的炎症因子应答,这是 OFs 与其他成纤维细胞的区别之一。例如,能够诱导 OFs 表达 PGE2 的白细胞调节素、IL-1 β 和 CD40L 对皮肤成纤维细胞没有类似的作用^[22]。虽然目前已明确 OFs 在 TAO 发病中起了关键作用,但它是如何侦测体内异常信号,进而激活下游信号通路,导致炎症反应的,目前尚不明确。

Toll 样受体是识别宿主以外的病原微生物分子——病原相关分子模式的关键受体,是机体免疫应答的第一道防线,同时也是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁。目前研究发现 TLRs 还能识别来自宿主自身的内源性分子,这些分子是宿主组织或细胞受到损伤、应激、缺氧等因素破坏后释放到细胞间隙或血液循环中的一类物质,例如热休克蛋白、核酸嘌呤代谢产物和核蛋白等,统称为 DAMPs。TLRs 信号通路被激活

后,能促进炎症因子释放和上调抗原提呈细胞表面共刺激分子,进而诱导 T、B 淋巴细胞分化为效应细胞。而在 TAO 等自身免疫性疾病患者体内,TLRs 过度激活,可能打破机体对自身抗原的免疫耐受,产生自身免疫性 T 淋巴细胞,识别甲状腺和眼眶组织中的自身抗原,产生相关抗体与之结合,可引起级联反应,导致自身免疫性疾病的发生发展^[23]。

目前,TLRs 已成为免疫研究的热点。国外研究发现,SLE 患者外周血单个核细胞 TLR7 和 TLR9 mRNA 的表达水平明显比正常人群中高^[24]。与稳定期 SLE 患者相比,活动期 SLE 患者外周血中表达 TLR9 的记忆性 B 细胞和浆细胞的比例明显升高,且在患者中记忆性 B 细胞的量与血清中抗 dsDNA 的量呈正相关,Papadimitraki ED 等人为这可能与凋亡细胞释放的内源性核酸分子被 B 细胞表面的 TLR9 识别,激活免疫反应,进而导致了 SLE 的发病^[25]。同样属于自身免疫性疾病的自身免疫性甲状腺疾病中,TLRs 的作用同样引起了研究人员的兴趣。Kawashima A 等^[18]则国外研究人员通过体外研究发现,人甲状腺细胞可以表达功能性 TLRs,这些受体既能识别外源性的 PAMPs,也可识别内源性的 DAMPs,产生促炎性细胞因子、趋化因子和 IFN- α ,并且证实了甲状腺细胞可以在没有免疫细胞辅助下启动天然免疫反应,导致甲状腺炎症,进而诱发自身免疫炎症。

我们设想,既然 TLRs 在 SLE 和自身免疫性甲状腺疾病发病中都发挥了重要作用,而 TAO 也被认为是自身免疫性疾病的一种,并且与甲状腺疾病密切相关,那么 TLRs 是否同样参与了 TAO 的发病过程?因此本课题组设计了本题目,希望对 TLRs 在 TAO 中的作用进行探究。本课题组前期通过搜集不同疾病分期的 TAO 患者的血液标本,检测外周血单个核细胞中各种 TLRs 的表达情况,发现在活动期 TAO 患者中 TLR9 mRNA 表达水平较正常对照人群明显升高,而稳定期 TAO 患者中 TLR9 mRNA 表达水平较正常对照人群下调。因此我们推测,TLR9 可能参与了 TAO 的发病过程,并且外周血单个核细胞中 TLR9 表达上调,可能与疾病活动有关。

前期我们只是在 TAO 患者外周血单个核细胞中检测了 TLR9 的表达情况,但 TAO 炎症反应的靶器官在眼部,主要效应细胞是 OFs。因此,要验证 TLR9 在 TAO 发病中的作用,首先要证实 OFs 中 TLR9 的表达是否与正常人群有差别,并且在活动期与稳定期 TAO 患者表达是否有差异。因此,我们选取 2017 年 3-4 月就诊于我院并

行眼眶减压手术的活动期和稳定期 TAO 患者, 选取同期在我院因美容要求行眼眶减压手术的正常人为对照, 均排除其他免疫性疾病。取眼眶脂肪结缔组织进行组织块培养获取 OFs 并鉴定, 取对数生长期细胞行 qRT-PCR 检测各组细胞 TLR9 mRNA 表达情况。mRNA 是 TLR 基因表达成受体的信使, 可以实时反应细胞内环境的变化, 而 qRT-PCR 是目前比较可靠、相对精确的半定量检测 mRNA 方法, 因此我们选择 qRT-PCR 检测 TLR9 mRNA 来验证各组 TLR9 的表达差异。

通过实验我们发现: TLR9 mRNA 在活动期 TAO 患者来源的 OFs 中表达水平明显高于正常对照组, 而在稳定期 TAO 患者来源的 OFs 中明显下调。我们推测 OFs 高表达 TLR9 可能与自身免疫反应活动期患者体内活跃的自身免疫炎症状态, 大量自身细胞破坏产生, 产生大量 TLR9 内源性配体, 诱导 TLR 高表达有关。而稳定期患者, TLR9 mRNA 表达下调, 可能与疾病趋于稳定, 内源性配体减少, 相关刺激因素消除, 进入相对抑制期有关。目前临床上对 TAO 患者的分期主要依据 CAS 评分, 存在主观偏差, 特别是评分在临界范围的患者, 很难界定疾病的活动情况。因此, 本实验的结果提示我们将来是否可以通过检测患者血液中 TLR9 表达情况进行临床分期。

在证实活动期 TAO 组 OFs 高表达 TLR9 mRNA 的基础上, 我们需要进一步验证其是否与疾病活动相关。TAO 疾病活动期的主要临床表现为: 眼外肌进行性增粗、眶脂肪增多、眼部充血、水肿等炎症状态。因此我们通过细胞活力和炎症因子表达水平的变化来验证 TLR9 与 TAO 之间的联系。我们选择 CpG-ODN 作为 TLR9 的特异性配体, 刺激各组 OFs, 结果活动期 TAO 组细胞活力明显升高, 而稳定期 TAO 组和正常对照组无明显变化, 细胞活力间接反映了细胞的增殖能力。并且 CpG-ODN 提高细胞活力与其作用的时间有关, 在作用 48 小时后细胞活力开始明显升高, 在低浓度 (200nM) 时起到提高细胞活力的作用, 而当 CpG-ODN 浓度进一步上升, OFs 的活力反而下降, 在 600nM 时最低。提示: 高表达 TLR9 的活动期 TAO 细胞与较低浓度的 CpG-ODN 结合后, 下游信号通路被激活, 促进细胞增殖, 而 OFs 最终可以分化成眼外肌细胞和眶脂肪细胞, 因此, 可以由此推测 TLR9 的高表达可能与 TAO 眼外肌增粗和眶脂肪增多有关, 而稳定期患者未出现类似变化, 与临床上进入稳定期后 TAO 患者突眼、斜视等症状不再变化相吻合。

我们进一步用 CpG-ODN 刺激各组 OFs, 用 qRT-PCR 的方法检测炎症因子 IL-6、

TNF- α 、ICAM-1 和 IFN- γ mRNA 表达水平的变化,结果显示在 CpG-ODN 作用 6h 时,活动期 TAO 组 IL-6、ICAM-1 和 IFN- γ mRNA 表达明显上调, TNF- α 表达轻度上调,在 12h 之后,各炎症因子表达显著下调,而稳定期组与正常对照组没有相同的变化趋势。进一步用 siRNA 下调活动期组 TLR9 表达水平后,上述炎症因子的表达也同时被下调。从正反两方面验证了 TLR9 表达升高可以激活炎症状态,可能与 TAO 的活动有关。

综上所述,我们的研究发现来源于活动期 TAO 患者的 OFs 高表达 TLR9,而 TLR9 与配体 CpG-ODN 结合后可激活下游信号通路,提高 OFs 活力,促进合成和分泌相关炎症因子 IL-6、TNF- α 、ICAM-1 和 IFN- γ mRNA,这提示 TLR9 可能参与了 TAO 的发病过程,并且与疾病的活动相关。本课题研究结果,是对 TAO 发病机制的补充。如果进一步证明外周血 TLR9 表达水平与 OFs TLR9 表达水平之间的存在正相关,则可通过检测外周血 TLR9 表达进行 TAO 准确临床分期。对于 TAO 的治疗,我们可以通过下调 TLR9 表达水平,下调炎症因子释放,降低细胞增殖活力,从根源上抑制 TAO 炎症与眼外肌和脂肪增生。

本实验的主要缺陷是,我们采用的实验组和对照组之间可能还存在一些混杂因素的影响,如果能够标准细胞株,通过诱导 TLR9 高表达和低表达,来进行干预实验,获得的数据将更有说服力。

结 论

基于以上研究，我们可以得出以下结论：

1、通过组织块培养法获取 OFs 是可靠而有效的。

2、TAO 活动期患者 OFs 高表达 TLR9，而稳定期患者 OFs 相对低表达，提示 TLR9 可能参与 TAO 活动期炎症反应过程，结合前期研究，检测血液中单个核细胞 TLR9 表达水平，或许可以作为区分 TAO 活动期与稳定期的一项临床指标。

3、用特异性配体激活 TLR9 后，OFs 细胞活力明显提高，提示 TAO 活动期眼外肌增生和眶脂肪增多可能与 TLR9 被激活有关。

4、TLR9 激活后，可诱导活动期 OFs 合成和分泌 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、IFN- γ 等炎症因子，而既往已有报导以上这些炎症因子参与 TAO 的炎症反应，因此我们可以推测 TLR9 可能参与了 TAO 活动期眼眶炎症反应过程。

参考文献

- [1] Abraham-Nordling M, Byström K, Töring O, Lantz M, Berg G, Calissendorff J, Nyström HF, Jansson S, Jörneskog G, Karlsson FA. Incidence of hyperthyroidism in Sweden [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2011, 165(6): 899-905.
- [2] Laurberg P, Berman DC, Bülow PI, Andersen S, Carlé A. Incidence and clinical presentation of moderate to severe graves' orbitopathy in a Danish population before and after iodine fortification of salt [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012, 97(7): 2325-2332.
- [3] Tanda ML, Piantanida E, Liparulo L, Veronesi G, Lai A, Sassi L, Pariani N, Gallo D, Azzolini C, Ferrario M. Prevalence and natural history of Graves' orbitopathy in a large series of patients with newly diagnosed graves' hyperthyroidism seen at a single center [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 98(4): 1443-1449.
- [4] Bahn RS. Graves' Ophthalmopathy [J]. *Archives of Ophthalmology*, 2010, 362(8): 726.
- [5] Douglas RS, Gupta S. The pathophysiology of thyroid eye disease: implications for immunotherapy [J]. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2011, 22(5): 385-390.
- [6] Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27(2): 225-233.
- [7] Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand [J]. *Journal of Immunology*, 2003, 171(8): 3977-3982.
- [8] Miettinen M, Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections [J]. *Genes & Immunity*, 2001, 2(6): 349-355.
- [9] Hoshino K, Kaisho T. Nucleic acid sensing Toll-like receptors in dendritic cells [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2008, 20(4): 408-413.
- [10] Anders HJ, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004, 15(4): 854.
- [11] Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus [J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 417-428.
- [12] Anders HJ. A Toll for lupus [J]. *Lupus*, 2005, 14(6): 417-422.
- [13] Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily [J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(7): 381.
- [14] Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T. [Cytokines in systemic lupus erythematosus] [J].

Przeegląd Lekarski, **1996**, 53(8): 623.

[15] Maria F, Marc E. Toll-like Receptors in Autoimmunity [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, **2010**, 1143(1): 21-34.

[16] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling [J]. Nature Reviews Immunology, **2007**, 7(5): 353-364.

[17] Ehlers M, Fukuyama H, Mcgaha TL, Aderem A, Ravetch JV. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE [J]. Journal of Experimental Medicine, **2006**, 203(3): 553-561.

[18] Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, **2008**, 49(10): 4453-4457.

[19] Kawashima A, Yamazaki K, Hara T, Akama T, Yoshihara A, Sue M, Tanigawa K, Wu H, Ishido Y, Takeshita F. Demonstration of Innate Immune Responses in the Thyroid Gland: Potential to Sense Danger and a Possible Trigger for Autoimmune Reactions [J]. Thyroid, **2013**, 23(4): 477-487.

[20] Wang Y, Smith TJ. Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **2014**, 55(3): 1735.

[21] Lagaye S, Vexiau P, Morozov V, Guenebaut-Claudet V, Tobaly-Tapiero J, Canivet M, Cathelineau G, Peries J, Emanoil-Ravier R. Human Spumaretrovirus-Related Sequences in the DNA of Leukocytes from Patients with Graves Disease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1992**, 89(21): 10070-10074.

[22] Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, Degroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **1995**, 80(1): 41-45.

[23] Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility [J]. Nature Immunology, **2012**, 13(6): 535-542.

[24] Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, Ozawa M, Togashi M, Masai R, Maki N, Hatakeyama T, Sawada K. Up - regulated expression of Toll - like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. Clinical & Experimental Immunology, **2008**, 152(3): 482.

[25] Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertsiias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, Raptopoulou A, Kritikos HD, Mamalaki C, Sidiropoulos P. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process [J]. Arthritis & Rheumatism, **2006**, 54(11): 3601.

综 述

甲状腺相关眼病病理生理机制研究现状

Research Status in the Pathological Mechanism of Thyroid-Associated Ophthalmopathy

【摘要】 甲状腺相关眼病（TAO）是一种与格雷夫斯病（GD）相关的免疫性疾病，在诊断为 GD 的患者中发病率接近 20%。无论 GD 患者的甲状腺激素水平的控制状态如何，即使在甲状腺功能正常或低下时，发病率都很高。眼部受累可能是由眼眶组织中存在自身抗体所致。除了免疫因素外，遗传因素、蛋白分子、细胞因子、矿物质（如硒）和环境因素（如吸烟）等，也在不同程度上参与了疾病的发生。到目前为止，TAO 的发病原因、诱因以及相关介质的研究还不明确。因此，本文的目的是回顾分析相关的文章，总结 TAO 病例机制研究的现状。

【关键词】 甲状腺相关眼病，格雷夫斯病，病理生理学

甲状腺相关眼病（TAO）是一种与格雷夫斯病（GD）相关的免疫性疾病，在诊断为 GD 的患者中发病率接近 40%^[1]。常见于 GD 患病一段时间的患者，并且在年龄相对较大的患者中发病明显增加。TAO 在女性中更常见，常伴有自身免疫性疾病，每 10 万人每年发病率为 16.3。根据 Tellez 等人的研究，欧洲人群的 TAO 发病风险是亚洲人群的 6.4 倍。严重的 TAO 病例占有所有病例约 3%-5%，并且在男性中病情更严重^[1,2]。

GD 患者眼部受累可能是由于眼眶组织中存在自身抗体所致，而与甲状腺功能控制状态无关。TAO 不仅发生在甲状腺机能亢进状态，也可出现在甲状腺机能正常甚至下降的时期，因为这些可能由甲亢治疗引起^[3]。除了在 TAO 的病理生理学中涉及的主要细胞（B 淋巴细胞，T 淋巴细胞和眼眶成纤维细胞）中存在的仍然不明确的免疫因素外，遗传因素、蛋白质、细胞因子、矿物质（如硒）和环境因素（吸烟）也在不同程度上促进了疾病的发生^[2,3]。鉴于 TAO 的病因、介质和诱因之间复杂且仍不明确

的相互作用，目前的假说很多，但往往缺乏有力的证据。本文的目的是回顾分析有关这个课题的文章。

本综述参考的文献是通过检索 PubMed 和 Cochrane 图书馆数据库获得的，采用如下关键词：眼病，眼眶，病理生理学和格雷夫斯。包括了从 2005 年到 2016 年之间出版的英文文章。据已有文献报导，TAO 的发病及其复杂，与众多因素密切相关，现综述如下：

1.遗传因素

丹麦的一项对单卵双胞胎人群的研究发现，TAO 发病的一致率为 35%。他们还发现 30%~60% 的患者有阳性家族史^[1]。根据之前的研究报道，欧洲人群中 TAO 的发病率高于亚洲人群，这在更大的层面说明，遗传因素在 TAO 的发病中发挥了重要作用。然而，至今尚不能确定某个特定基因或特定基因组合决定了 TAO 的发生与进展。这是因为在不同人群的进化过程中，每个地理区域都具特定的感染因素，这可能导致免疫反应的多态性。随后发生的自身免疫反应可能与不同的易感基因或基因组有关^[1,4]。

Jacobson 和 Tomer 的研究发现，影响 GD 发展的大部分基因都是人体免疫系统的组成部分，如信号感受器、分子和肽^[4]。 γ 受体相关的过氧化物酶体增殖物 Pro(12)Ala 基因的多态性已被证实与 TAO 遗传性脂肪增生倾向相关。这种基因多态性在伴或不伴眼部受累的 GD 患者中均可发现，并且在合并 TAO 的患者中，存在多态性的人群病情相对较轻^[4]。Ban 等在一项对日本人群的研究中发现，TAO 与单核苷酸多态性基因 rs2358994 与 BCL2L15 存在关联^[5]；另一个来自瑞典的研究，在 4 条基因（BTG2，CYR61，ZFP36 和 SCD）中发现了 10 种单核苷酸多态性^[6]。研究证实有几种免疫调节基因参与了 TAO 的发病，这验证了 TAO 是免疫性疾病的观点，这些基因是：人类白细胞抗原（HLA）DR3、HLA-B8、细胞毒性 T 淋巴细胞抗原（CTLA-4）、白细胞介素-1、IL-23 受体、CD40、蛋白酪氨酸磷酸酶、PTPN22、T 细胞受体 β 、肿瘤坏死因子 β （TNF β ），以及几种与重链免疫球蛋白相关的基因^[2]。

就 TAO 严重性而言，携带 HLA-B8、DR3 和 DQA*0501 单体型基因的个体病情相对较重，而 HLA-DR B1*07 似乎降低了 TAO 易感性，具有保护作用^[1,4]。Akaiishi 等人在对来自巴西的 81 名 TAO 患者和 161 名正常对照者的研究中发现，眼外肌受累

多见于携带 16 号 HLA-DRB1 等位基因的个体,而在携带 03 号 HLA-DRB1 等位基因的个体中较少出现[1]。同时存在高血清浓度的 CTLA-4 AG 和该蛋白质 17 号密码子的多态性与病情严重性有关,但这一发现并未在具有相同遗传特征的大量患者队列研究中得到验证^[4]。这些基因还与 TAO 的严重性相关,并与 PPAR γ 表达有关,而 PPAR γ 与眼眶脂肪增生有关^[4]。研究 IL-23 时,发现了两种基因多态性(rs10889677 和 rs2201841), TAO 患者发生率升高 1.8 倍^[4]。

2.免疫学机制

2.1 淋巴细胞

B 和 T 淋巴细胞在免疫过程中至关重要。当发现外来抗原时, B 淋巴细胞(包括 B1 和 B2 亚型)可发生增殖、迁移并产生抗体。这一系列过程基本上通过两种方式发生: B 淋巴细胞被抗原直接激活或通过与其表面的 CD40 蛋白与 T 细胞表面的 CD40 结合剂结合。这种相互作用使得 T 淋巴细胞产生细胞因子并再刺激 B 淋巴细胞产生特异性免疫球蛋白^[3,7,8]。

T 淋巴细胞通过它们的表面受体识别抗原。它们识别与主要组织相容性复合体蛋白(MHC)结合或抗原呈递细胞(包括巨噬细胞, B 细胞和树突细胞)表面上的特定肽^[8]。T 淋巴细胞在两种情况可被激活:抗原-MHC 复合物结合 T 淋巴细胞受体时;来自抗原呈递细胞(可能是 B 淋巴细胞)表面的 B7 分子与 T 淋巴细胞表面的 CD28 结合时^[8]。T 淋巴细胞的激活可诱导特定类型效应细胞增殖和分化,否则这些细胞不能被激活。这种被称为外周耐受的现象是体内主要的耐受机制之一,可以防止自身免疫的发生。然而,当这些防御机制失效时,就会导致自身免疫性疾病的发生^[8]。Th17 亚型的 T 淋巴细胞与多种自身免疫性疾病如多发性硬化症、类风湿性关节炎和牛皮癣有关。在 TAO 中,这些细胞进入眼眶,产生细胞因子,如 IL-23R,而 IL-23 的变体与该病症的发生密切相关,但这种过程的确切机制尚未明确。Th17 亚型 T 淋巴细胞也会刺激眼眶中的 B 淋巴细胞产生针对自身抗原(如来源于眼眶成纤维细胞的 TSH-R 和 IGF-1R)的自身抗体^[8]。TAO 患者中也观察到 FoxP3 阳性或阴性、CD4、CD25 阳性表达的 T 细胞群。

2.2 成纤维细胞

TSH-R 普遍存在于眼眶成纤维细胞表面, 但只有 TAO 患者发生免疫反应, 并且 TAO 患者血清 IGF-1R 浓度升高^[2]。成纤维细胞被抗 IGF-1R 自身抗体刺激后, 将产生一些细胞因子, 如 IL-16、RANTES 和 CXCL10, 这些细胞因子会吸引更多的 T 淋巴细胞, 进而产生更多的细胞因子, 如 IFN γ 、TNF α 、PGD₂、和 15d-PGJ₂^[7]。基于此, 成纤维细胞被激活后, 会合成细胞外基质分子如透明质酸并刺激其他成纤维细胞, 诱导眼眶中脂肪组织的堆积, 导致 TAO 特征性改变^[1]。眼眶成纤维细胞根据其表面标志物分无不同亚型, 一些研究根据 Thy-1 将成纤维细胞分为成肌纤维细胞 (Thy-1⁺) 和脂肪细胞 (Thy-1⁻)。这些细胞暴露于特定的因素如炎症时, 会对身体不同部位的重塑起重要作用。例如, 在眼眶, Thy-1 成纤维细胞向脂肪细胞分化, 这可以解释 TAO 中眼眶体积的扩大^[3, 7]。

纤维细胞来源于骨髓中的单核细胞系, 可以进入组织损伤部位。它们与成纤维细胞、单核细胞、T 和 B 淋巴细胞、上皮细胞、内皮细胞和树突状细胞不同, 可以分化为成熟细胞如脂肪细胞、成骨细胞和肌成纤维细胞^[7]。显然, 纤维细胞类似于成纤维细胞。一旦纤维细胞浸润到已经受损的组织并开始重塑, 它们就呈现成纤维细胞样形态, 其表面 CD34 表达消失, 这表明这种蛋白质是一种祖细胞标志物。

GD 是一种自身免疫疾病, 在其激素生成过程中甲状腺增大并活动过度。这种效应与针对 TSHR 的自身抗体活性增加有关。此外, IGF-1 受体 (IGF-1R) 在 TAO 患者眼眶成纤维细胞和 T、B 淋巴细胞中过表达。IGF-1R 是一种潜在的致病性自身抗原, 可促进甲状腺增生, 诱导淋巴细胞迁移至受影响的组织, 如胫前结缔组织和眶组织^[2]。

在由莱曼等^[8]进行的一项研究表明, GD 患者 T 淋巴细胞向眼眶移位可能由成纤维细胞对免疫球蛋白 G (IgG-GD) 的免疫应答介导。然后这些成纤维细胞表达高水平的 T 淋巴细胞趋化因子、IL-16 和 RANTES^[8]。除趋化因子外, 在 TAO 患者的眼眶中发现的成纤维细胞合成大量结缔组织生长因子 (CTGF)、透明质酸, 其积聚可引起局部组织水肿^[6, 9]。眶内结缔组织极易发生炎症, 约 30% 的 GD 患者, 可发展呈 TAO, 可伴有 T 和 B 淋巴细胞和肥大细胞的浸润。TAO 趋化因子和细胞因子似乎能够激活局部成纤维细胞, 这种成纤维细胞具有独特的表型^[1, 3]。受 TAO 影响的眼眶成

纤维细胞由异质细胞群体组成，并对促炎细胞因子如来自 IL-1 家族的细胞因子反应明显。当被 IL-1 β 和 CD154 激活时，这些细胞产生透明质酸，导致透明质酸合酶(HAS) 1,2 和 3 以及尿苷酰转移酶葡萄糖脱氢酶的激活。HAS 异构体的这种过度诱导会导致透明质酸在 TAO 中的积累^[3]。当被激活时，眼眶成纤维细胞也表达 IL-6、IL-8 和前列腺素内过氧化物合成酶 2、炎性环氧合酶，导致前列腺素 E2 (PGE2) 的释放增多。这种前列腺素可能在眼眶免疫反应中发挥重要作用^[3]。TAO 的成纤维细胞产生 IL-1 受体拮抗剂 (IL-1 RA) 的能力较低，导致对抗由 IL-1 α 和 IL-1 β 所引起的炎症反应的能力减弱。在眼眶成纤维细胞中发生的免疫应答似乎比在这些细胞的其他表型中观察到的要丰富得多^[3]。这些细胞可以分为可分化为脂肪细胞的成纤维细胞 (Thy-1-) 和肌成纤维细胞 (Thy-1+) ^[3]。当暴露于前列环素时，(Thy-1-) 成纤维细胞，可因 cAMP 或 PPAR γ 分子表达上调，使细胞更易发生分化或迁移。当暴露于 TGF- β 时，Thy-1+ 成纤维细胞更易分化并高表达肌动蛋白。与这些分化同时发生，TSHR 表达可增加，但不能确定两种类型的成纤维细胞中的哪一种与这种增加有关^[3, 10]。

道格拉斯等研究发现 GD 患者的循环系统中纤维细胞数比健康受试者高得多。与其他研究一样，他们同样发现在已知的慢性病中很少发现由外周血单个核细胞分化来的纤维细胞^[10]。另一方面，GD 患者有许多由外周血单个核细胞分化来的纤维细胞，这与疾病持续时间，甲状腺激素水平或治疗时间都无关，这些细胞可表达 CXCL-12 / CXCR4^[11]。但并非所有 GD 患者的循环纤维细胞和成纤维细胞以及 IGF-1R 水平都高于对照组^[12]。

道格拉斯等对他们研究的 TAO 患者进行表型区分，CD34+、Col1+、IGF-1R+ 细胞受 TAO 患者眼眶组织中明显增多，但在对照组中未有发现。这些细胞同时不表达 CD31，表明它们与内皮细胞无关^[12]。在纤维细胞表面还检测到高水平的 TSHR，与在甲状腺上皮细胞类似，是由激素介导的。更重要的是，它们也是活性。当与促甲状腺激素 (bTSH) 或 M22 (针对 TSHR 的单克隆抗体) 结合时，炎性细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的产生显着上调^[12]。当他们对 TAO 患者成纤维细胞进行了细胞分析时，发现了 CD34+、Col1+ 细胞亚型。而来自对照组的成纤维细胞样品中未检测到 CD34+ 淋巴细胞，这些细胞表面绝大多数表达 CD90^[12]。

2.3 TSHR

研究显示,在健康人群和TAO患者眼眶脂肪组织中的均可发现TSHR mRNA^[3,4]。患者中TSHR表达更明显,其血清水平与疾病临床评分呈正相关,但还不知道抗TSHR抗体(Trab)是如何在眼眶组织和成纤维细胞中发信号通知TSHR的。有观点认为Trab可能有不同亚型,仍然不能被现有研究的方法检测到,并且是造成眼眶和皮肤组织不同反应的原因^[2,4]。Eckstein等推测对抗炎治疗反应不佳的TAO患者血清中可检测到Trab,而在治疗反应良好的患者中却检测不到^[4]。

3.生化因素

3.1 甲状腺素和三碘甲状腺氨酸

针对血清甲状腺素(T4)和三碘甲状腺原氨酸(T3)值在TAO发生或恶化中的作用,分析几项近期研究,发现存在很大争议,特别是当涉及亚洲和非亚洲人群的研究时,这再次提示遗传因素在疾病发生发展和临床过程中的重要性^[4]。

3.2 烟草

在所有TAO危险因素中,关于吸烟的观点是最一致和无争议的^[1,4,13]。在一项对新诊断并接受放射性碘或抗甲状腺药物治疗的GD患者的研究中,吸烟是TAO发生的最大危险因素,优势比为5.2(95%CI: 2.4 - 11.5)。在这项研究的第二阶段,香烟被证明与TAO更相关,优势比为9.8(95%CI: 2.9 - 34.9)^[4]。一个重要的结论是吸烟者GD的治疗选择并不影响TAO的发病风险,但在以前的研究中认为,GD患者吸烟并接受放射性碘治疗发生TAO的风险更高。这些患者在3年内表现出进展为TAO的风险为50%^[4]。不管采用何种治疗手段(碘治疗,使用抗甲状腺药物和/或皮质类固醇激素),与对照组相比,吸烟者发展和恶化的可能性都较高^[4]。风险也与每天吸烟数量成正比^[4]。在欧洲,通过针对10岁以下儿童的TAO和二手烟之间关系的问卷调查,当这些国家的吸烟率高于25%时,眼部受累儿童的比例为52%,而在这种比例在流行率较低的国家为19%。目前,没有前瞻性研究证实吸烟与TAO的发病机制之间的关系,只知道它会加重病情,导致治疗的临床反应下降。然而,几项回顾性研究证据表明吸烟与TAO发病之间存在关联^[4]。

3.3 甲状腺球蛋白

甲状腺球蛋白作为 TAO 介质作用的假设始于 Konishi 等人的研究。McDougall 和 Kriss^[12]认为甲状腺球蛋白会通过淋巴途径迁移到眼眶，在那里被抗甲状腺球蛋白抗体识别，引起眼眶炎症。十五年后，马蒂诺等人在三名 TAO 患者的眼眶后组织中发现了完整的甲状腺球蛋白，但是没有观察到甲状腺球蛋白抗甲状腺球蛋白复合物，因此这些作者仍然以细胞介导的自身免疫假说来解释 TAO 的病理生理机制^[14]。

4.4 蛋白质

Matheis 等人在未治疗的 TAO 患者眼眶组织发现了 10 种蛋白质表达上调，他们是： β IV 血影蛋白（6.2 倍）、GTP 结合 G 蛋白 2（5.6 倍）、POTE 锚蛋白结构域家族成员 F（5.4 倍）、木酮糖激酶（4.1 倍）、驱动蛋白家族成员 1A 和脂质运载蛋白 1（均为 3.6 倍）、氨基脲敏感性金属蛋白酶胺氧化酶 3 和聚合酶 I 转录物释放因子（均为 3.4 倍）、细胞周期蛋白延长酶 A 结合蛋白 1（3.3 倍）、膜联蛋白 A2 和蛋白酶（均为 3 倍）、蛋白质指向细胞增殖组蛋白 H4（2.8 倍）和 ADAM 金属蛋白酶与血小板反应蛋白 1 型基序 14（2.7 倍）^[15]。

4.机械因素

由于 TAO 炎症过程中存在眼眶脂肪和眼外肌的体积增加，因眼球移位至眼眶前区而发生眼球突出。这种机制作为补偿过程发生，因此正常的眶内压力被重新建立^[4]。与对照组相比，TAO 患者似乎具有更宽的外侧眶壁角度，这一事实也出现在非炎症性突眼上，称为非综合征性眼球突出^[4]。这些解剖变异的眼眶轮廓，以及其静脉和淋巴管的网状变化，可以部分解释为什么有时在同一个人中存在不对称的眼部受累^[4]。此外，与没有近视的 TAO 相比，具有更高程度近视的个体表现为更明显的眼球突出^[4]。

5.放射性碘疗法

几项回顾性队列研究和随机试验表明放射性碘治疗是 TAO 发生和恶化的危险因素，其发生率 15%~39%。当放射性碘治疗与使用抗甲状腺药物相比时，这些比率是 38.7%，与手术相比，这个比率是 16%^[4]。然而，这些研究区别很大，因为它们采

用了不同的参数来定义 TAO 的发展并且缺乏定义好的疾病活动评估标准。

6. 硒元素

硒参与人体各种生物过程。硒依赖性酶通常具有抗氧化和抗炎作用^[16, 17]。谷胱甘肽过氧化物酶可以减少过氧化氢和磷脂过氧化物,从而减少自由基和活性氧的种类。氢过氧化物的低循环浓度降低炎性前列腺素和白三烯的产生。这一系列事件有助于减少甲状腺自身免疫炎症反应^[17]。其作用主要是通过硒蛋白 Trx 还原酶和 GPx 作为抗氧化剂^[17]。Trx 是一种压力和碘诱导的蛋白质,它具有强烈的氧化还原活性,并且在 GD 中出现增加,在甲状腺滤泡细胞中表达。硒通过 Trx 还原酶,通过抑制 Trx 的形成,减少其炎症作用起作用^[17]。

在 GD 的高代谢急性状态中,氧和细胞内 ATP 的更新增加,导致线粒体功能障碍和导致细胞损伤的自由基的出现。当 GPx 被激活时,硒可激活“二线”抗氧化防御,能够中和自由基的生物效应,补充由超氧化物歧化酶和过氧化氢酶所代表的第一线反应^[17]。这些活性氧以及过氧化氢可以刺激 NF- κ B 通路, NF- κ B 通路是负责炎症免疫应答的主要途径,并且与 TNF- α 和 IL-6 的增加相关。硒抑制 NF- κ B 与其基因启动子结合,从而减少细胞因子的产生,减轻炎症^[17]。甲状腺功能亢进症的实验研究表明,在这种状态下,受磷脂酰肌醇钙级联刺激的 Trx 和 Gpx 系统增加,以及红细胞中的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽增加。因此,当这一过程由于甲状腺机能亢进时间而变长时,可能会失败,需要补充硒膳食^[18]。

Ashok 等^[19]人对 60 名自身免疫性甲状腺疾病患者进行了一项双盲随机研究,所有患者的抗 TPO 均大于 150 IU / mL, 2 个月时, 30 名患者每日接受 200 μ g 硒,另外 30 名接受安慰剂。该研究排除孕妇和已接受临床治疗的患者,如使用抗甲状腺药物或可影响自身免疫反应的任何其他药物。硒治疗的患者中,有 6 成为甲状腺功能减退,另外 15 个有亚临床甲减, 6 归其甲状腺激素水平, 3 例亚临床甲亢。在用硒处理的组中,抗 TPO 浓度显著下降了 49.5% ($P < 0.013$)^[18]。Gärtner 等人^[18]在一项前瞻性临床研究中报告,在巴伐利亚州(德国东南部地区)使用硒和安慰剂的情况下,硒组的抗 TPO 滴度下降了 36%。抗 TPO 基线水平高于 1200 IU / mL 的患者中这种下降甚至更大^[1]。Zhang 等人(2016)指出 Forkhead 转录因子(FOXO)在调节 TAO 患者的成纤维细胞和前脂肪细胞的脂肪形成中起重要作用,因为当使用 FOXO 抑制剂

AS1842856 或其增强剂三氟拉嗪盐酸盐 (TFP) 时发现 FOXO 的增加与较低的轨道脂肪形成有关, 并且这些是开发新的免疫抑制疗法的可能替代物^[19]。

目前, 尽管在诸多文献中对 TAO 发展中可能存在的各种机制的研究已经有许多了, 但对于这种疾病的复杂性病理生理学的每一种机制的实际作用仍然没有共识。仍有待于更多进一步的基础研究来探明 TAO 的发病机制。

参考文献

- [1] Maheshwari R, Weis E. Thyroid associated orbitopathy [J]. *Bmj Case Rep*, **2012**, 60(2): 87-93.
- [2] Douglas RS, Gupta S. The pathophysiology of thyroid eye disease: implications for immunotherapy [J]. *Current Opinion in Ophthalmology*, **2011**, 22(5): 385-390.
- [3] Naik VM, Naik MN, Goldberg RA, Smith TJ, Douglas RS. Immunopathogenesis of thyroid eye disease: emerging paradigms [J]. *Survey of Ophthalmology*, **2010**, 55(3): 215-226.
- [4] Stan MN, Bahn RS. Risk factors for development or deterioration of Graves' ophthalmopathy [J]. *Thyroid*, **2010**, 20(7): 777-783.
- [5] Ban Y, Tozaki T, Nakano Y. Association Studies of the GPR103 and BCL2L15 Genes in Autoimmune Thyroid Disease in the Japanese Population [J]. *Frontiers in Endocrinology*, **2016**, 7.
- [6] Planck T, Shahida B, Sjögren M, Groop L, Hallengren B, Lantz M. Association of BTG2, CYR61, ZFP36, and SCD Gene Polymorphisms with Graves' Disease and Ophthalmopathy [J]. *Thyroid*, **2014**, 24(7): 1156-1161.
- [7] Lehmann GM, Feldon SE, Smith TJ, Phipps RP. Immune mechanisms in thyroid eye disease [J]. *Thyroid*, **2008**, 18(9): 959-965.
- [8] Khong JJ, Wang LY, Smyth GK, Mcnab AA, Hardy TG, Selva D, Llamas B, Jung CH, Sharma S, Burdon KP. Differential Gene Expression Profiling of Orbital Adipose Tissue in Thyroid Orbitopathy [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **2015**, 56(11): 6438-6447.
- [9] Wang G, Zhang W, Meng W, Liu J, Wang P, Lin S, Xu L, Li E, Chen G. Expression and clinical significance of connective tissue growth factor in thyroid carcinomas [J]. *The Journal of international medical research*, **2013**, 41(4): 1214.
- [10] Douglas RS, Afifiyan NF, Hwang CJ, Chong K, Haider U, Richards P, Gianoukakis AG, Smith TJ. Increased generation of fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, **2010**, 95(1): 430-438.
- [11] Fernando R, Atkins SJ, Smith TJ. Intersection of chemokine and thyrotropin receptor

pathways in human fibrocytes: Emergence of CXCL-12/CXCR4 crosstalk potentially relevant to thyroid-associated ophthalmopathy [J]. **2016**: en.2016-1382.

[12] Smith TJ. Potential role for bone marrow-derived fibrocytes in the orbital fibroblast heterogeneity associated with thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *Clinical & Experimental Immunology*, **2010**, 162(1): 24–31.

[13] Wiersinga WM. Graves' orbitopathy: Management of difficult cases [J]. *Indian Journal of Endocrinology & Metabolism*, **2012**, 16(Suppl 2): S150.

[14] Shanmuganathan T, Girgis C, Lahooti H, Champion B, Wall JR. Does autoimmunity against thyroglobulin play a role in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy: a review [J]. *Clinical Ophthalmology*, **2015**, 9(Issue 1): 2271.

[15] Matheis N, Lantz M, Grus FH, Ponto KA, Wolters D, Brorson H, Planck T, Shahida B, Pitz S, Pfeiffer N. Proteomics of Orbital Tissue in Thyroid-Associated Orbitopathy [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2015**, 100(12): E1523.

[16] Weeks BS, Hanna MS, Cooperstein D. Dietary selenium and selenoprotein function [J]. *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research*, **2012**, 18(8): RA127.

[17] Duntas LH. The evolving role of selenium in the treatment of graves' disease and ophthalmopathy [J]. *J Thyroid Res*, **2012**, 2012(6): 736161.

[18] Bhuyan AK, Sarma D, Saikia UK. Selenium and the thyroid: A close-knit connection [J]. *Indian Journal of Endocrinology & Metabolism*, **2012**, 16(Suppl 2): S354-S355.

[19] Zhang L, Ji QH, Ruge F, Lane C, Morris D, Tee AR, Dayan CM, Ludgate M. Reversal of pathological features of Graves' Orbitopathy by activation of Forkhead transcription factors, FOXOs [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2015**, 101(1): jc20152932.

在读期间发表论文和参加科研工作情况说明

一、在读期间发表论文：

1.魏锐利,陈子瑜,程金伟. Graves 眼病的管理:解读 2016 欧洲甲状腺协会及欧洲 GO 专家组指南[J]. 中华眼科杂志, 2017, 53(2). (署名单位: 第二军医大学附属长征医院眼科; 本人署名次序: 2)

2.Mou P, Chen Z, Jiang L, et al. PTX3: A Potential Biomarker in Thyroid Associated Ophthalmopathy[J]. 2018. (署名单位: 第二军医大学附属长征医院眼科; 本人署名次序: 共一)

二、参加科研工作情况：

上海市卫计委科研课题面上项目：Toll 样受体 7 及其信号通路参与甲状腺相关眼病发病的效应及机制研究（2017.01-2019.12）。负责该项目的样本收集与实验实施。

致 谢

本课题研究的开展及学位论文的书写是在我的导师魏锐利教授的悉心指导下完成的。对待医学，他治学严谨，精益求精，始终怀揣一颗探索未知的好奇心；对待病患，他朴实无华，细致入微，时时刻刻想的是方便病患；对待学生，他平易近人，宽严相济，犹如父亲般关爱着我们。三年来，魏老师不仅传授给我许多宝贵的临床经验、从医之道，更对我的家庭提供了无微不至的关怀。在此谨向魏锐利老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意，您就像我人生道路上的一盏明灯，这段路途有您相伴真好。

感谢吴联群老师在我临床、科研工作中给予的指导与帮助，感谢您前期的工作作为我的研究生课题奠定了良好的基础，感谢您时刻的督促与关心，帮我顺利完成了研究生的课题。感谢牟旆师姐、俞丹洋师兄对我实验课题及方法的指点。

感谢蔡季平教授、李由教授、程金伟副教授、马晓晔副教授、李玉珍老师、黄潇老师、周晓晴老师、梁文君老师、张韵老师、苏晴师姐等对我临床和科研工作给予的帮助。感谢科室的各位同事在临床工作中给予的帮助。与你们相识是我研究生期间的重要收获之一！

感谢长征医院转化医学中心实验室王振华老师、张利平师姐、陈辰同学等对我实验设计和实验技术的指导和帮助。

感谢爱人邹洁女士对我工作学习给予的巨大支持，没有你担起了家庭的重担，为我排忧解难，就没有我今天的成绩，军功章上有你的一半！

感谢我的父母、岳父母和我的亲人，我的成长离不开你们默默的奉献与支持！

最后感谢所有关心过我、帮助过我的人！你们是我一生中最宝贵的财富！