

# 胰岛素样生长因子-1 对甲状腺相关眼病眼眶成纤维细胞的促生长作用

代佳灵 何为民 罗梦绮

610000 成都, 四川大学华西医院眼科

通信作者: 何为民, Email: hewm888@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.008

**【摘要】** 背景 甲状腺相关眼病(TAO)是一种自身免疫性疾病,目前对其发病机制的研究主要集中在共同抗原上。胰岛素样生长因子-1(IGF-1)功能的发挥需要 IGF-1 受体(IGF-1R)的参与,IGF-1 在促甲状腺激素受体(TSHR)的信号传导通路中也起着重要作用。目的 探讨 IGF-1 对 TAO 患者眼眶成纤维细胞(OFs)增生及 IGF-1R、TSHR 表达的影响,探讨 IGF-1 在 TAO 发病机制中的作用。方法 收集 2016 年 3—6 月于四川大学华西医院行 TAO 眼眶脂肪切除术取得的眶组织标本 17 例 17 份及正常人美容手术取得的眶组织 4 人 4 份,采用含体积分数 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养 OFs。分别于培养液中加入不同质量浓度(0、50、100、125  $\mu\text{g/L}$ )的 IGF-1,采用 MTS 比色法绘制 OFs 生长曲线,评估 IGF-1 对 TAO 和正常来源 OFs 增生的影响;采用流式细胞术测定不同质量浓度 IGF-1 对 TAO 和正常来源 OFs 中 IGF-1R、TSHR 表达水平的影响。结果 TAO 患者与正常人来源的 OFs 均生长良好,呈梭形,细胞质丰富,TAO 患者与正常人来源的 OFs 形态学特点一致。培养的 OFs 波形蛋白呈阳性反应,结蛋白、S-100、肌红蛋白和角蛋白均呈阴性反应。不同质量浓度 IGF-1 作用后 TAO 组和正常组 OFs 增生均呈逐渐上升趋势,总体比较差异有统计学意义( $F_{\text{分组}} = 219.639, P < 0.001$ ;  $F_{\text{质量浓度}} = 17.752, P < 0.001$ ),以 100  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 的促进作用最强。0、50、100、125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 作用后 TAO 组 OFs 中 IGF-1R 表达量分别为(0.009 1 $\pm$ 0.008 7)%、(0.095 3 $\pm$ 0.023 3)%、(0.083 7 $\pm$ 0.022 7)%和(0.070 9 $\pm$ 0.024 1)%,正常组 OFs 中 IGF-1R 表达量分别为(0.002 3 $\pm$ 0.000 6)%、(0.009 3 $\pm$ 0.001 2)%、(0.007 3 $\pm$ 0.001 5)%和(0.008 3 $\pm$ 0.001 2)%,其中 50、100 和 125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 作用后各组 OFs 中 IGF-1R 表达量均高于无添加 IGF-1 者,TAO 组 OFs 细胞中 IGF-1R 的表达量均明显高于正常组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );0、50、100 和 125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 作用后 TAO 组和正常组 OFs 中 TSHR 表达量的总体比较差异均无统计学意义( $F_{\text{分组}} = 0.133, P > 0.05$ ;  $F_{\text{质量浓度}} = 0.004, P > 0.05$ )。结论 IGF-1 对 TAO 患者和正常人 OFs 的生长均有促进作用并能上调 OFs 中 IGF-1R 的表达,但其对 OFs 中 TSHR 的表达变化无明显影响。

**【关键词】** 甲状腺相关眼病; 眼眶成纤维细胞/代谢; 胰岛素样生长因子-1/代谢; 胰岛素样生长因子-1 受体/代谢; 促甲状腺激素受体/代谢; 细胞增生/药物作用; 细胞培养

**基金项目:** 四川省科技计划项目(2013SZ0029); 成都市惠民科技项目(2014-HM01-001420SF)

**Promoting effects of insulin-like growth factor-1 on proliferation of orbital fibroblasts derived from thyroid associated ophthalmopathy** Dai Jialing, He Weimin, Luo Mengqi

Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610000, China

Corresponding author: He Weimin, Email: hewm888@hotmail.com

**【Abstract】** **Background** Thyroid associated ophthalmopathy (TAO) is an autoimmune disease. Current research on the pathogenesis focuses on common autoantigen. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) is necessary for the function of IGF-1, also IGF-1 plays an important role in signaling pathway of thyroid stimulating hormone receptor (TSHR). **Objective** This study was to investigate the effects of IGF-1 on the proliferation, expression of IGF-1R and TSHR on cultured orbital fibroblasts (OFs) derived from TAO. **Methods** Human orbital tissue was obtained from 17 TAO patients who received orbital adipectomy and 4 normal controls who received cosmetic surgery in West China Hospital from March 2016 to June 2016. OFs were cultured by explant culture with DMEM/F12 containing 5% fetal bovine serum and identified by immunocytochemistry. The OFs were treated with different concentrations of IGF-1. IGF-1 at different concentrations (0, 50, 100, 125  $\mu\text{g/L}$ ) was added into the medium, respectively, and the proliferation of the cells (absorbancy) was detected by MTS. The percentages of IGF-1R and TSHR expressions in the cells were assayed by flow cytometry. **Results** Cultured cells appeared to be

spindle-like in shape and grew well with abundant cytoplasm. The characteristics of the cells derived from TAO patients were consistent with normal ones. The cells showed the positive response for vimentin and absent response for desmin, S-100, myoglobin and cytokeratin. The proliferative values of OFs were gradually elevated with the increase of IGF-1 dose in both TAO group and normal group ( $F_{\text{group}} = 219.639, P < 0.001$ ;  $F_{\text{concentration}} = 17.752, P < 0.001$ ) with the optimal effects in 100  $\mu\text{g/L}$  IGF-1. The expression levels of IGF-1R in the OFs were  $(0.0091 \pm 0.0087)\%$ ,  $(0.0953 \pm 0.0233)\%$ ,  $(0.0837 \pm 0.0227)\%$  and  $(0.0709 \pm 0.0241)\%$  in the TAO group, and those in the normal group were  $(0.0023 \pm 0.0006)\%$ ,  $(0.0093 \pm 0.0012)\%$ ,  $(0.0073 \pm 0.0015)\%$  and  $(0.0083 \pm 0.0012)\%$  after treatment of 50, 100, 125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1. The expression levels of IGF-1R were significantly higher after treatment of 50, 100 and 125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 than those treatment of 0  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 in both TAO group and normal group, and the expression levels of IGF-1R in the OFs were significantly increased in the TAO group compared with the normal group (all at  $P < 0.05$ ). No statistical difference was seen in the TSHR expression between the TAO group and normal group after treatment of 0, 50, 100 and 125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 ( $F_{\text{group}} = 0.133, P > 0.05$ ;  $F_{\text{concentration}} = 0.004, P > 0.05$ ).

**Conclusions** IGF-1 can promote the proliferation of OFs and up-regulate the expression of IGF-1R in OFs. However, IGF-1 dose not play a regulating effect on the expression of TSHR in OFs.

**[Key words]** Thyroid associated ophthalmopathy; Fibroblasts, orbit/metabolisms; Insulin-like growth factor-1/metabolism; Receptor, insulin-like growth factor-1/metabolism; Receptors, thyrotropin/metabolism; Cell proliferation/drug effects; Cells, cultured

**Fund program:** Science and Technology Plan of Sichuan Province (2013SZ0029); Chengdu Huimin Science and Technology Project (2014-HM01-001420SF)

甲状腺相关眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO)病理机制复杂,病因尚不十分清楚,目前认为眼眶成纤维细胞(orbital fibroblasts, OFs)是 TAO 发病的靶细胞和效应细胞<sup>[1-2]</sup>。研究表明促甲状腺激素受体(thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)、胰岛素样生长因子-1受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)等共同抗原的自身免疫反应在 TAO 发病过程中发挥重要作用<sup>[3-5]</sup>。但尚不十分清楚 TAO 患者眼眶组织中 IGF-1 水平的增高是否影响 OFs 上共同抗原的表达及其与疾病活动度的相关性。本研究探讨 IGF-1 对体外培养 OFs 增生的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 组织来源** 收集 2016 年 3—6 月于四川大学华西医院眼科经眼眶脂肪切除术获取的 TAO 患者眶内组织标本 17 例 17 份,另从 4 名接受美容手术者获取正常眼眶脂肪组织标本 4 份。标本的采集和应用经四川大学华西医院生物医学伦理委员会批准[2016 年审(76)号],受检者均签署知情同意书。TAO 患者中男 7 例,女 10 例;年龄 33~52 岁;其中经眶周注射曲安奈德治疗半年以上者 4 例,经眼眶放射治疗半年以上者 1 例;临床活动度评分(clinical activity score, CAS)  $\geq 4$  分者 3 例, CAS  $< 4$  分者 14 例;符合 TAO 的诊断标准<sup>[6]</sup>,即眼睑退缩合并甲状腺功能异常或调节异常、眼球突出、视神经功能障碍、眼外肌受累、排除其他类似眼病之一者,或无眼睑退缩,但有甲状腺功能异常

或调节异常且合并眼球突出、视功能障碍、眼外肌受累之一者。患者若行眶周注射曲安奈德或眼眶放射治疗需间隔 6 个月以上。有全身免疫系统疾病或肿瘤以及近 6 个月内全身应用糖皮质激素、免疫抑制剂的患者眶组织不予采集。行美容手术者中男 1 名,女 3 名;年龄 28~49 岁。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM/F12 培养基(美国 Hyclone 公司);重组人 IGF-1(以色列 Prospec 公司);兔抗人 S100 一抗(Ab52642, 1:200)、兔抗人肌红蛋白一抗(Ab77232, 1:250)、兔抗人结蛋白一抗(Ab32362, 1:2000)、兔抗人角蛋白一抗(Ab181595, 1:2000)、兔抗人波形蛋白一抗(Ab92547, 1:200)(英国 Abcam 公司);羊抗兔 Cy3 标记二抗(天津厚普生物公司);鼠抗人 FITC-TSHR 抗体(sc-32262 Fitc)(美国 Santa Cruz 公司);鼠抗人 PE-IGF-1R 抗体(555999)、鼠抗人 IgG<sub>1</sub>-FITC-TSHR 抗体(556652)、鼠抗人 IgG<sub>1</sub>-PE-IGF-1R 抗体(555749)(美国 BD 公司)。细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);IX71 型荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司);CKX41SF 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 OFs 的培养** 采用组织块培养法,将获得的脂肪组织剔除血管,剪成约 1 mm<sup>3</sup> 的脂肪块置于注入含体积分数 20% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) DMEM/F12 培养液的 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,放入体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱在 37 °C、饱和湿度条件下进行培养。

于培养后 2~3 d 换液,采用酶消化法传代,取第 3 代细胞用于后续实验。

**1.2.2** 采用免疫荧光染色法鉴定培养的 OFs 将获得的细胞分别置于 12 孔板中,并在 12 孔板中放置盖玻片,待细胞长满玻片后,吸去培养液,PBS 漂洗 3 次,质量分数 4% 多聚甲醛固定 10 min。采用体积分数 3%  $H_2O_2$ /PBS 室温孵育细胞,PBS 漂洗。用 10% FBS 封闭 15 min,滴加相应一抗及血清,4 °C 孵育过夜;滴加羊抗兔 IgG-Cy3 二抗,37 °C 孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;封片,荧光显微镜下观察。

**1.2.3** MTS 法绘制 OFs 生长曲线 取显微镜下观察胞膜完整,透明度大,融合约 80% 的 OFs 接种于 96 孔板,细胞密度为  $1 \times 10^4$ /孔。将培养的细胞分为 TAO 组和正常组,各组内再分为实验组、对照组和空白调零组。实验组分别加入不同质量浓度的 IGF-1,使终质量浓度分别为 50、100 和 125  $\mu\text{g/L}$ ,对照组加入细胞和 5% FBS DMEM/F12 培养液 200  $\mu\text{l}$ ,空白调零组为用 200  $\mu\text{l}$  含 5% FBS 的 DMEM/F12 培养液。每日 13:00 在 96 孔板中加入 20  $\mu\text{l}$  MTS 溶液,于 37 °C、5%  $CO_2$  培养箱中培养 4 h,采用酶联免疫检测仪比色法测定波长 490 nm 处各孔的吸光度(A)值,空白孔调零作为基线值。以时间为横轴,A 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

**1.2.4** 流式细胞术检测各组细胞中 IGF-1R 和 TSHR 的表达 将培养的 TAO 患者与正常人 OFs 接种于培养皿中,细胞密度为  $1 \times 10^6$ /皿,按照分组分别添加 50、100 和 125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1,将培养皿置于 37 °C、5%  $CO_2$  培养箱中培养 72 h,添加 PBS,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /100  $\mu\text{l}$ ,将细胞悬液移至 EP 管,4 °C 避光条件下培养。将细胞分为空白对照组、阴性对照组、同型对照 1 组和同型对照 2 组。空白对照组不加入抗体,阴性对照组加入 3  $\mu\text{l}$  PE-IGF-1R 抗体+5  $\mu\text{l}$  FITC-TSHR 抗体,同型对照 1 组加入 3  $\mu\text{l}$  PE-IGF-1R 抗体+5  $\mu\text{l}$  IgG<sub>1</sub>-FITC-TSHR 抗体,同型对照 2 组加入 5  $\mu\text{l}$  FITC-TSHR 抗体+3  $\mu\text{l}$  IgG<sub>1</sub>-PE-IGF-1R 抗体,实验组 EP 管内分别加入 3  $\mu\text{l}$  PE-IGF-1R 抗体+5  $\mu\text{l}$  FITC-TSHR 抗体。各组细胞吹打混匀后,将 EP 管置于 4 °C 冰上避光孵育 20 min。用 500  $\mu\text{l}$  PBS 洗涤,离心半径 10 cm,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清。吹打混匀,调整总体积为 300  $\mu\text{l}$ ,移至流式管中,上机检测,通过百分比量化。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  进行描述。采用均衡分层分组协方差分析研究设计,

TAO 组和正常组 OFs 用不同质量浓度 IGF-1 作用后细胞的增值值(A 值)变化以及 OFs 中 IGF-1R 和 TSHR 表达率变化的差异比较均采用区组设计两因素方差分析,组内和组间的多重比较采用 LSD-t 检验。采用双尾检验法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 培养的 OFs 形态学特点

TAO 患者与正常人来源的 OFs 在体外培养过程中均表现出良好的分裂增殖能力,传代后第 1 天细胞轮廓清楚,细胞体较大,呈长梭形或扁平星状,带有突起或伪足(图 1),细胞质丰富。TAO 患者与正常人来源的 OFs 形态学特点一致。

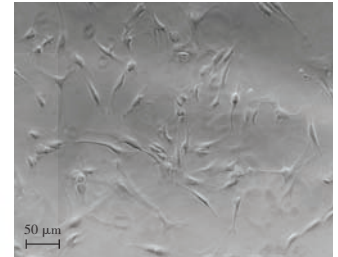


图 1 光学显微镜下传代后第 1 天的 OFs 形态学特点 细胞呈梭形,可见突起( $\times 200$ ,标尺 = 50  $\mu\text{m}$ )

### 2.2 OFs 的鉴定

培养的 OFs 对波形蛋白抗原呈阳性反应,说明细胞为间叶(中胚层)来源,对结蛋白、S-100、肌红蛋白和角蛋白抗原均呈阴性反应,证实为 OFs(图 2)。

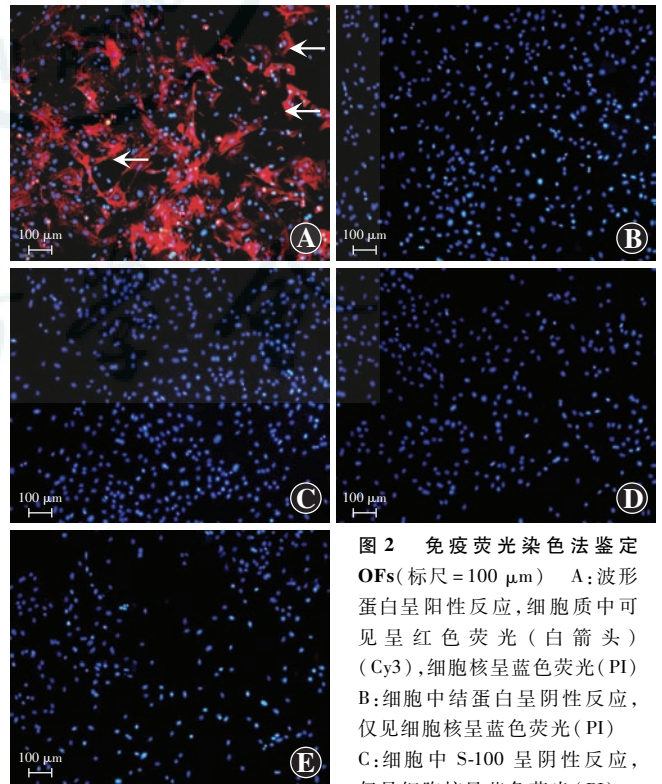


图 2 免疫荧光染色法鉴定 OFs(标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) A: 波形蛋白呈阳性反应,细胞质中可见呈红色荧光(白箭头)(Cy3),细胞核呈蓝色荧光(PI) B: 细胞中结蛋白呈阴性反应,仅见细胞核呈蓝色荧光(PI) C: 细胞中 S-100 呈阴性反应,仅见细胞核呈蓝色荧光(PI) D: 细胞中肌红蛋白呈阴性反应,仅见细胞核呈蓝色荧光(PI) E: 细胞中角蛋白免疫荧光染色呈阴性反应,仅见细胞核呈蓝色荧光(PI)

### 2.3 各组 OFs 增生情况

TAO 组和正常组 OFs 用 50、100 和 125 μg/L IGF-1 作用后,随着 IGF-1 质量浓度的升高,OFs 的生长曲线均逐渐上移(图 3)。不同组间及 0、50、100 和 125 μg/L IGF-1 间 OFs 的 A 值总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 219.639, P < 0.001$ ;  $F_{\text{质量浓度}} = 17.752, P < 0.001$ ),其中 100 μg/L IGF 作用后细胞 A 值最大,与 50 μg/L 和 125 μg/L IGF 作用后比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 1)。

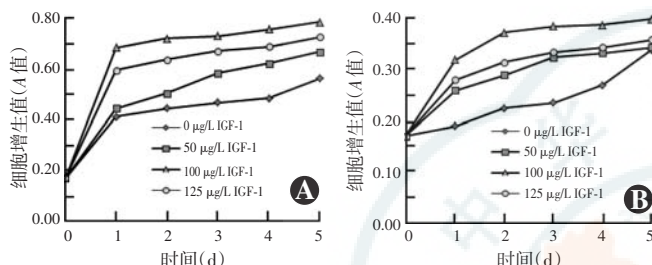


图 3 不同质量浓度 IGF-1 作用后 OFs 的生长曲线 各质量浓度 IGF-1 作用于细胞后 1 d, OFs 细胞呈快速增生,之后各时间点呈缓慢增生,以 100 μg/L IGF-1 作用后细胞增生最为明显 A:TAO 组 OFs 生长曲线 B:正常组 OFs 生长曲线 IGF:胰岛素样生长因子

表 1 不同质量浓度 IGF-1 作用后各组 OFs 增值比较 ( $\bar{x} \pm s, A$  值)

组别	样本量	不同质量浓度 IGF-1 作用后 A 值			
		0 μg/L	50 μg/L	100 μg/L	125 μg/L
TAO 组	17	0.48 ± 0.06	0.56 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.66 ± 0.05 <sup>abc</sup>
正常组	4	0.25 ± 0.07 <sup>d</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>ad</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>d</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 219.639, P < 0.001$ ;  $F_{\text{质量浓度}} = 17.752, P < 0.001$ . 与各自的 0 μg/L IGF-1 作用值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的 50 μg/L IGF-1 作用值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自组内 100 μg/L IGF-1 作用值比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的 TAO 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IGF:胰岛素样生长因子; OFs:眼眶成纤维细胞; TAO:甲状腺相关眼病

### 2.4 不同质量浓度 IGF-1 作用后 OFs 中 IGF-1R 和 TSHR 的表达变化

2.4.1 IGF-1 作用后 OFs 中 IGF-1R 的表达 流式细胞仪检测结果显示,TAO 患者及正常人 OFs 中均有 IGF-1R 表达(图 4A,B)。减除同型对照组背景荧光后,TAO 组 OFs 中 IGF-1R 的表达水平明显高于正常组,差异有统计学意义 ( $t = 0.028, P < 0.05$ )。不同质量浓度 IGF-1 作用后 TAO 组及正常组 OFs 中 IGF-1R 的表达量增加。50 μg/L IGF-1 作用后 1 例 TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 表达率为 24.2%, TSHR 的表达率为 1.0% (图 4C); 1 名正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达

率为 0.9% (图 4D); 100 μg/L IGF-1 作用后 1 例 TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 的表达率为 12.7% (图 4E), 1 名正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达率为 0.7% (图 4F); 125 μg/L IGF-1 作用后 1 例 TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 的表达率为 9.0% (图 4G), 1 名正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达率为 0.6% (图 4H); 50、100 和 125 μg/L IGF-1 作用后 TAO 患者及正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达水平明显不同,总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 89.466, P < 0.001$ ;  $F_{\text{质量浓度}} = 11.199, P < 0.001$ ), 50 μg/L IGF-1 作用后细胞中 IGF-1R 表达量明显高于 100 μg/L 和 125 μg/L IGF-1 作用值,同质量浓度 IGF-1 作用后 TAO 组细胞中 IGF-1R 表达量明显高于正常组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 2)。

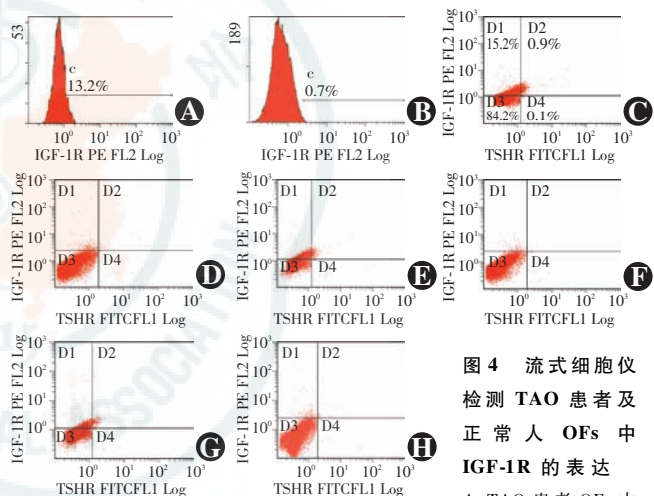


图 4 流式细胞仪检测 TAO 患者及正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达

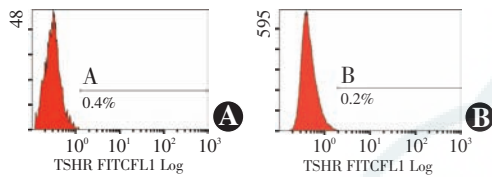
A:TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 的表达水平 B:正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达水平明显低于 TAO 患者 C:50 μg/L IGF-1 作用后 TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 的表达水平 D:50 μg/L IGF-1 作用后正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达水平明显低于同剂量 IGF-1 作用的 TAO 患者 E:100 μg/L IGF-1 作用后 TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 的表达水平 F:100 μg/L IGF-1 作用后正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达水平明显低于同剂量 IGF-1 作用的 TAO 患者 G:125 μg/L IGF-1 作用后 TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 的表达水平 H:125 μg/L IGF-1 作用后正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达水平低于同剂量 IGF-1 作用的 TAO 患者 IGF-1R:胰岛素样生长因子-1 受体; TSHR:促甲状腺激素受体

表 2 不同质量浓度 IGF-1 作用后各组 OFs 中 IGF-1R 表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本量	不同质量浓度 IGF-1 作用后 IGF-1R 表达量			
		0 μg/L	50 μg/L	100 μg/L	125 μg/L
TAO 组	17	0.009 1 ± 0.008 7	0.095 3 ± 0.023 3 <sup>a</sup>	0.083 7 ± 0.022 7 <sup>a</sup>	0.070 9 ± 0.024 1 <sup>ab</sup>
正常组	4	0.002 3 ± 0.000 6 <sup>c</sup>	0.009 3 ± 0.001 2 <sup>ac</sup>	0.007 3 ± 0.001 5 <sup>abc</sup>	0.008 3 ± 0.001 2 <sup>ac</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 89.466, P < 0.001$ ;  $F_{\text{质量浓度}} = 11.199, P < 0.001$ . 与各自组内 0 μg/L IGF-1 作用值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自组内 50 μg/L IGF-1 作用值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的 TAO 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IGF:胰岛素样生长因子; OFs:眼眶成纤维细胞; IGF-1R:胰岛素样生长因子-1 受体; TAO:甲状腺相关眼病

**2.4.2 不同质量浓度 IGF-1 作用后 OFs 中 TSHR 表达量变化** 流式细胞仪检测显示,TAO 组及正常组 OFs 中 TSHR 的表达水平均较低,组间总体比较差异无统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 0.133, P > 0.05$ )。50、100 和 125  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 作用后正常组和 TAO 组 OFs 中 TSHR 的表达水平与 0  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 培养后均无明显变化(图 5)。不同质量浓度 IGF-1 作用后 OFs 中 TSHR 的表达水平总体比较差异无统计学意义 ( $F_{\text{质量浓度}} = 0.004, P > 0.05$ ) (表 3)。



**图 5 流式细胞仪检测 OFs 中 TSHR 的表达** A: TAO 患者 OFs 中 TSHR 的表达水平 B: 正常人 OFs 中 TSHR 的表达水平稍低于 TAO 患者 TSHR: 促甲状腺激素受体

**表 3 不同质量浓度 IGF-1 作用后 OFs 中 TSHR 表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	样本量	不同质量浓度 IGF-1 作用后 TSHR 表达量			
		0 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	125 $\mu\text{g/L}$
TAO 组	17	0.004 3 $\pm$ 0.002 0	0.004 7 $\pm$ 0.023 3	0.004 6 $\pm$ 0.002 3	0.004 5 $\pm$ 0.001 8
正常组	4	0.002 3 $\pm$ 0.000 6	0.002 0 $\pm$ 0.001 0	0.002 0 $\pm$ 0.000 0	0.002 0 $\pm$ 0.000 2

注:  $F_{\text{分组}} = 0.133, P > 0.05; F_{\text{质量浓度}} = 0.004, P > 0.05$  (区组设计两因素方差分析)

IGF: 胰岛素样生长因子; OFs: 眼眶成纤维细胞; TSHR: 促甲状腺激素受体; TAO: 甲状腺相关眼病

### 3 讨论

TAO 的研究至今尚未建立成熟有效的动物模型,作为靶细胞和效应细胞,OFs 在 TAO 的发病机制中发挥独特的生物学活性,目前 TAO 发病机制研究中主要将 OFs 作为研究工具。

IGF-1 的分子结构与胰岛素类似,主要存在于血液循环中,可在肝脏中表达,也可通过自分泌或者旁分泌的形式产生<sup>[7]</sup>。IGF-1 可与跨膜受体 IGF-1R 及胰岛素样结合蛋白结合,调控生物体生长发育、细胞增生分化及能量代谢等<sup>[8-9]</sup>。研究发现,IGF-1 信号系统调节异常与心血管疾病、神经变性疾病、代谢性疾病以及肿瘤密切相关<sup>[8]</sup>,甲状腺相关眼眶病患者来源的成纤维细胞中 IGF-1R 呈高表达<sup>[10]</sup>,TAO 患者眼眶组织中 IGF-1 表达水平增高,IGF-1 促进透明质酸的生成<sup>[11]</sup>,通过免疫荧光染色可检测到 TAO 患者 OFs 中 IGF-1R 的表达,且 IGF-1R 表达水平高于正常人<sup>[12]</sup>,提示 IGF-1R 可能是 TAO 的一种自身抗原,在 TAO 的发病机制中起重要作用。

为研究 IGF-1 对 OFs 增生的影响,尽量避免血清

成分对细胞生长的影响,本研究中采用含 5% FBS 的 DMEM/F12 培养液处理培养的细胞,并采用 MTS 法观察 IGF-1 对 OFs 增生的影响。MTS 法是检测细胞增生的常用方法,其原理为活细胞线粒体内的多种脱氢酶将 MTS 转化为可溶性甲臞化合物,在波长 490 nm 处测定的 A 值能间接反映培养液中活细胞的数目。本研究发现,IGF-1 促进 OFs 的增生,100  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 的作用最强,提示 IGF-1 的促增生作用具有饱和效应,眼眶局部组织中 IGF-1 表达水平的增加可以促进 OFs 增生,从而加重 TAO 病情。

本研究中采用流式细胞术检测发现,未加入 IGF-1 刺激时,TAO 患者来源的 OFs 中 IGF-1R 表达水平高于正常人。该结果与 Pritchard<sup>[13]</sup> 及 Smith 等<sup>[10]</sup> 的发现相同。加入 IGF-1 刺激后,TAO 患者及正常人 OFs 中 IGF-1R 的表达水平显著提高,说明 IGF-1 可以刺激 OFs 中 IGF-1R 的表达,以 50  $\mu\text{g/L}$  IGF-1 对 IGF-1R 刺激作用最强。本研究结果发现,IGF-1 促进 OFs 增生及 IGF-1R 表达的最佳剂量分别为 100  $\mu\text{g/L}$  和 50  $\mu\text{g/L}$ ,提示 OFs 细胞数量的增加并未引起 IGF-1R 表达量的增加,OFs 细胞数量及密度的增加可能在某种程度上会抑制 IGF-1R 的表达。

TAO 是眼眶组织的炎症性自身免疫性疾病<sup>[14]</sup>,其发病与存在于甲状腺和眼眶之间的共同抗原有关,TSHR 是共同抗原其中之一<sup>[15-16]</sup>。OFs 可以分泌功能性 TSHR,TAO 患者来源的 OFs 中 TSHR mRNA 表达水平明显高于正常人<sup>[17]</sup>,活动期 TAO 患者的眼眶脂肪组织中 TSHR mRNA 表达量也高于静止期患者<sup>[18]</sup>,且促甲状腺激素受体抗体 (thyrotrophin receptor antibody, TRAb) 水平与 TAO 病情的严重程度、活动性和疾病的预后相关<sup>[19-20]</sup>,此外,TSHR 还参与透明质酸的合成以及 OFs 向脂肪细胞的分化<sup>[21]</sup>。因此 TSHR 作为 OFs 上的自身抗原可能是 TAO 发病机制中的自身免疫对象,但目前尚无直接证据表明 TSHR 或 TRAb 参与 TAO 的发病。

本研究中 TAO 组患者 CAS < 4 分者占 82.3%,大部分患者的病变处于疾病静止期。本研究发现 IGF-1 在 50 ~ 125  $\mu\text{g/L}$  的质量浓度范围内,对 OFs 上 TSHR 的表达无明显刺激作用。流式细胞术检测发现,正常人及 TAO 患者来源的 OFs 中 TSHR 的表达水平均较低,两者之间的表达水平无明显差异,提示静止期 TAO 患者 OFs 中 TSHR 蛋白水平呈低表达状态,加入

IGF-1 刺激后 TAO 患者及正常人来源的 OFs 中 TSHR 表达水平无明显增高,提示 IGF-1 对 OFs 细胞表面 TSHR 的表达无刺激作用,TSHR 在 OFs 中的表达可能与其他因子有关,还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Smith TJ, Janssen JA. Building the case for insulin-like growth factor receptor-I involvement in thyroid-associated ophthalmopathy [J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 7: 167 [2016-10-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206614/>. DOI: 10.3389/fendo.2016.00167.
- [2] Bahn RS. Current insights into the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy [J]. *Horm Metab Res*, 2015, 47 (10): 773-778. DOI: 10.1055/s-0035-1555762.
- [3] Krieger CC, Place RF, Bevilacqua C, et al. TSH/IGF-1 receptor cross talk in Graves' ophthalmopathy pathogenesis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101 (6): 2340-2347. DOI: 10.1210/jc.2016-1315.
- [4] Khong JJ, McNab AA, Ebeling PR, et al. Pathogenesis of thyroid eye disease: review and update on molecular mechanisms [J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100 (1): 142-150. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-307399.
- [5] Chen H, Mester T, Raychaudhuri N, et al. Teprotumumab, an IGF-1R blocking monoclonal antibody inhibits TSH and IGF-1 action in fibrocytes [J/OL]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99 (9): E1635-1640 [2016-10-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4154099/>. DOI: 10.1210/jc.2014-1580.
- [6] Bartley GB, Gorman CA. Diagnostic criteria for Graves' ophthalmopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 1995, 119 (6): 792-795.
- [7] Jung HJ, Suh Y. Regulation of IGF-1 signaling by microRNAs [J/OL]. *Front Genet*, 2014, 5: 472 [2016-10-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292735/>. DOI: 10.3389/fgene.2014.00472.
- [8] Chen H, Shan SJ, Mester T, et al. TSH-Mediated TNF $\alpha$  production in human fibrocytes is inhibited by teprotumumab, an IGF-1R antagonist [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10 (6): e0130322 [2016-07-01]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130322>. DOI: 10.1371/journal.pone.0130322.
- [9] Chen LH, Chiou GY, Chen YW, et al. MicroRNA and aging: a novel modulator in regulating the aging network [J]. *Ageing Res Rev*, 2010, 9 Suppl 1: S59-66. DOI: 10.1016/j.arr.2010.08.002.
- [10] Smith TJ, Hegedüs L, Douglas RS. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012, 26 (3): 291-302. DOI: 10.1016/j.beem.2011.10.002.
- [11] Wang Y, Smith TJ. Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (3): 1735-1748. DOI: 10.1167/iovs.14-14002.
- [12] Song D, Wang R, Zhong Y, et al. Locally produced insulin-like growth factor-1 by orbital fibroblasts as implicative pathogenic factor rather than systemically circulated IGF-1 for patients with thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250 (3): 433-440. DOI: 10.1007/s00417-011-1876-5.
- [13] Pritchard J, Han R, Horst N, et al. Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway [J]. *J Immunol*, 2003, 170 (12): 6348-6354.
- [14] Bahn RS. Graves' ophthalmopathy [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (8): 726-738. DOI: 10.1056/NEJMra0905750.
- [15] Salvi M, Campi I. Medical treatment of Graves' orbitopathy [J]. *Horm Metab Res*, 2015, 47 (10): 779-788. DOI: 10.1055/s-0035-1554721.
- [16] Smith TJ. TSH-receptor-expressing fibrocytes and thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11 (3): 171-181. DOI: 10.1038/nrendo.2014.226.
- [17] Raychaudhuri N, Fernando R, Smith TJ. Thyrotropin regulates IL-6 expression in CD34+ fibrocytes: clear delineation of its cAMP-independent actions [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e75100 [2016-05-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3783445/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0075100.
- [18] Kumar S, Nadeem S, Stan MN, et al. A stimulatory TSH receptor antibody enhances adipogenesis via phosphoinositide 3-kinase activation in orbital preadipocytes from patients with Graves' ophthalmopathy [J]. *J Mol Endocrinol*, 2011, 46 (3): 155-163. DOI: 10.1530/JME-11-0006.
- [19] Kahaly GJ, Diana T, Glang J, et al. Thyroid stimulating antibodies are highly prevalent in hashimoto's thyroiditis and associated orbitopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101 (5): 1998-2004. DOI: 10.1210/jc.2016-1220.
- [20] Lytton SD, Ponto KA, Kanitz M, et al. A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95 (5): 2123-2131. DOI: 10.1210/jc.2009-2470.
- [21] Iyer S, Bahn R. Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of the TSH receptor [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012, 26 (3): 281-289. DOI: 10.1016/j.beem.2011.10.003.

(收稿日期:2016-11-10)

(本文编辑:尹卫靖 张荻)

读者·作者·编者

## 本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)