

加强我国眼眶病的基础和转化研究

范先群 贾仁兵 周慧芳

200011 上海,上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科

通信作者:范先群,Email:fanxq@sh163.net

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.11.001

【摘要】 眼眶病是临床上常见的、种类较多且转归复杂的一类眼科疾病,主要包括炎症、外伤、肿瘤和血管性疾病,可导致视力损害、眼部结构破坏、面部外观畸形,甚者威胁患者的生命。由于眼眶病种类较多,部分疾病的发病机制和治疗方法复杂,眼眶病的诊断和治疗对专科医生的综合素质要求很高。近年来,国内外学者非常重视眼眶病的基础研究工作,尤其在甲状腺相关眼病(TAO)的致病基因及其调控分子研究,各种原因引起的眼眶骨缺损修复和再生研究,眼眶淋巴瘤发病机制和免疫分型研究,眼眶静脉畸形的病理基础和表现遗传机制研究等,已成为研究热点并取得了一定的进展。然而,我国的眼眶病基础研究起步晚,相关研究人员少,尚不能满足目前眼眶病研究的需求,在眼眶病的基础研究方面面临着很大挑战。应该充分利用我国眼眶病患者数量多、科研资金投入逐渐增加的优势,加大创新性基础研究力度,在此基础上开展临床转化研究,不断提高我国眼眶病的基础和转化研究水平。

【关键词】 眼眶病; 基础研究; 转化研究

Pay attention to the basic and translational researches on orbital diseases Fan Xianqun, Jia Renbing, Zhou Huifang

Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China.

Corresponding author: Fan Xianqun, Email: fanxq@sh163.net

【Abstract】 Orbital diseases are common, comprehensive, complicated and a variety of eye diseases, mainly including inflammation, trauma, tumors and vascular lesions. Orbital diseases may lead to a large variety of compromises such as decrease of vision, destroy of ocular structures, disfigured of appearance and even threaten patient's life. There is a quite high requirement for the comprehensive quality of orbital surgeon due to lot of disease kinds, unelucidated pathogenesis and complex therapy methods. In recent years, a broad spectrum of basic researches on orbital diseases are emphasized and carried out, especially in the studies on causal genes and regulatory molecules of thyroid associated ophthalmopathy (TAO) combined environmental factors and genetics background, mechanism of orbital bone defect repair and regeneration on orbital microenvironment and osteogenic promoting materials, identification of specific targets playing key roles in growth and metastasis of orbital tumors, investigation of epigenetics mechanism in orbital venous malformation on the basis of damage of elastic fiber of smooth muscle as a basic pathological feature, etc. China has made great progress in a few aspects of orbital diseases and gained international recognition. However, it is realized that the relevant basic research in China faces with great challenges because of later start and fewer researchers. Therefore, much more efforts need to be made in China to catch up with developed countries at overall level. We should consolidate basic researches of orbital diseases taking advantages of much more patients and increasing financial support from our governments. Then step by step translational researches and clinical trials with selected points can be performed to promote the levels of diagnosis and management of orbital diseases.

【Key words】 Orbital diseases; Basic research; Translational research

眼眶病是一类常见的眼科疑难疾病,包括炎症、肿瘤、外伤和血管性病变,严重损害视功能,破坏眼部的组织结构,造成颅面畸形,甚至引起死亡。近年来随着

疾病谱的改变和诊疗水平的提高,眼眶病患者的数量和临床诊疗需求显著增加。目前国内外学者在眼眶病的热点和难点问题上开展了深入的基础研究,如研究

环境因素和遗传因素在发病中的相互作用,探索甲状腺相关眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO)致病基因及其调控机制;研究眼眶微环境特点和眼眶修复材料特殊性,阐明眼眶骨缺损修复和骨再生机制;研究眼眶恶性肿瘤生长和转移的关键机制,明确其治疗的特异性作用靶点;研究眼眶静脉畸形发病过程中血管张力结构破坏的病理基础,诠释其表观遗传机制等。我国在眼眶病的临床诊疗研究方面取得了长足的进步,部分领域已达到了国际先进水平,但在眼眶病的基础研究领域则起步晚,原创性研究成果少。一个国家的临床转化能力主要取决于基础研究水平,因此我国的眼科研究者应充分利用患者数量多和国家科研资金投入不断增加的优势,针对下列热点和方向进行创新性基础研究和转化医学研究,为提高我国眼眶病的诊疗水平打下坚实基础。

1 TAO 发病机制和转化研究

TAO 发病率居眼眶病首位,可造成眼球突出、眼睑退缩、限制性斜视、角膜溃疡和压迫性视神经病变等,甚至导致视力丧失。由于对发病机制认识的局限性,目前临床上主要采用非特异性的糖皮质激素药物治疗、放射治疗和手术治疗,患者的疗效和预后存在显著差异。深入开展 TAO 的发生和发展的动态调控机制研究及寻求新的特异性治疗靶点是 TAO 精准诊疗的关键。

遗传和环境因素的相互作用是 TAO 发病的始动环节。识别 TAO 易感基因及其免疫调节作用有助于我们理解 TAO 的遗传学机制。目前已经发现了多个与 TAO 发病有关的易感基因,如免疫调节相关的功能基因: *HLA-DR3*、*CTLA4*、*PTPN22*、*CD40*、*IL-2RA*、*FCRL3* 和 *IL23-R*, 以及甲状腺特异性蛋白质的编码基因,如 *TSHR* 和甲状腺球蛋白^[1-2]。此外,表观遗传学在 TAO 发病中的作用逐渐受到关注,包括 DNA 甲基化、组蛋白变构、基因组印记、RNA 干扰和 X 染色体失活等^[1], 但有关 TAO 的基因遗传学和表观遗传学与疾病的发生和发展的因果关系尚未完全明了。

免疫功能紊乱是 TAO 病理损伤的基础。眼眶成纤维细胞是 TAO 的效应细胞,其生物学行为和免疫调节功能非常复杂,具有明显的异质性。在 TAO 患者的球后组织中发现来源于骨髓的纤维细胞,能够合成 I 型胶原,表达 CD34 和 CXCR4,且自身抗原促甲状腺激素受体(thyroid-stimulating hormone receptor, TSHR)呈高表达,受多种细胞因子的趋化作用后可能迁移至眼眶靶组织。纤维细胞可分化为肌成纤维细胞或脂肪细

胞,可能与 TAO 的组织重构、细胞增生分化以及参与组织变性过程有关^[3-4]。已有研究表明,Th1 和 Th2 细胞是作为 TAO 的主要淋巴细胞亚群,能够识别这些 CD34⁺ 和 TSHR⁺ 的成纤维细胞,进而产生大量的细胞因子,造成细胞外基质的沉积和脂肪增生^[1]。我们的研究发现,Th17 细胞能够导致 TAO 的纤维化变性以及招募更多的 Th1 细胞和/或其本身到眼眶靶组织中,加重局部炎症反应,因此在国际上率先提出了 Th17 细胞在 TAO 中的致病作用^[5]。

迄今为止,相关的研究均不能系统地归纳和完整地阐明遗传、环境和免疫因素在 TAO 发病和进展中的作用。要将遗传学或者表观遗传学调控下的自身免疫紊乱更加清晰地加以阐述,需要将基础和临床研究更精确地和更完整地结合起来,从寻找基因组、转录组或蛋白质组的特定突变入手,深入探讨这些变异对 TAO 自身免疫功能的影响及进而产生 TAO 免疫炎症损伤的机制,这正是未来 TAO 研究的重点和方向,也是实现 TAO 精准诊疗的关键途径。许多研究已揭示了 Th1 细胞和巨噬细胞来源的细胞因子对早期 TAO 的致病作用,因此,针对前炎症因子和趋化因子的单克隆抗体进行干预有望成为该病的治疗手段。生物制剂,特别是白细胞介素(interleukin, IL)-1 受体阻断剂 anakinra、IL-6 阻断剂 tocilizumab、转化生长因子- β 阻断剂 lerdelimumab 和 GC1008、肿瘤坏死因子 α 阻断剂 infliximab、adalimumab、etanercept,在 TAO 的治疗中前景广阔^[6],抗 CD20 单抗 rituximab 对活动期 TAO 也有良好的治疗效果。TAO 的发病机制复杂,患者的症状和预后差异较大,如何规范地且有针对性地使用这些生物制剂、治疗过程中如何联合用药、是否能够使对糖皮质激素不敏感的患者获益,这一系列的临床问题均需大量的基础和临床研究加以证实,实施大样本、多中心的前瞻性随机对照研究,建立 TAO 的诊疗规范和专家共识对实现精准诊疗的目标大有裨益。

2 眼眶骨再生的微环境、干细胞和活性材料研究

眼眶结构复杂,内含眼球和视神经等重要组织,具有特殊的微环境,因此,眼眶骨缺损的修复对于手术技术和修复材料的要求非常高。随着图像处理技术的进步、内窥镜技术和导航系统的应用以及 3D 打印技术的发展,眼眶手术在学科融合和交叉的基础上不断进步,逐渐趋于精准、安全和微创^[7-8]。但是,目前临床上常用的眼眶修复材料,例如高密度聚乙烯、钛网等均为不可降解材料,可发生组织排异、感染及囊肿形成等并发症。因此,开发具有生物活性的支架材料并促进

眼眶自体骨再生是目前眼眶骨折修复的研究热点。

目前已证实骨髓基质干细胞、脂肪间充质干细胞、胚胎干细胞及其他来源干细胞等均可作为眼眶骨修复重建的种子细胞,其中前两者具备来源充足、成骨性能佳等优点而广泛用于眼眶骨再生研究。外源性细胞外因子的补充、细胞内基因水平调控和腺病毒转染、微胶囊缓释等技术可以增强干细胞的成骨分化能力,从而促进眼眶自体骨再生^[9]。我们进一步在表观遗传学水平研究 DNA 甲基化和微小 RNA 等在干细胞成骨分化调控机制中的作用,证实微小 RNA 如 miR-31、miR-135 等具有调控干细胞成骨分化的作用,为微小 RNA 在眼眶骨修复中的应用提供了实验依据^[10]。

各种人工材料,包括金属支架,羟基磷灰石、磷酸三钙等无机材料,聚乳酸内酯、聚乳酸、聚羟基乙酸等高分子可降解材料也广泛应用于眼眶骨缺损修复的研究中,但均存在难以克服的缺陷。近年来,生物活性材料成为眼眶修复材料的研究重点,支架材料负载骨形态发生蛋白 2、血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子、细胞外基质等的应用促进了支架材料的骨诱导活性^[11]。为了从根本上提高支架材料的生物活性,已有研究结合基因治疗技术,开发了具有调控成骨相关基因表达水平的基因活性支架。随着纳米技术的发展,纳米生物支架在促进眼眶骨修复方面显示出重要的研究价值,纳米活性支架的开发也正是眼眶修复材料的主要研究方向^[12]。

眼眶骨不仅具有骨壁菲薄、应力小、成骨细胞来源少、血液供应差等特点,而且与鼻窦和口腔颌面区相毗邻,骨壁的一侧为骨膜,另一侧覆盖的则是鼻窦黏膜,微环境不同于四肢骨和脊柱等,在骨缺损修复过程有其特殊性。研究发现,与眼眶毗邻的鼻窦黏膜对眼眶骨的修复发挥重要的调节作用,在采用细胞膜片技术制备鼻窦黏膜并用复合支架材料构建黏膜-材料复合体修复眼眶骨缺损的研究中发现,鼻窦黏膜微环境可以明显促进眼眶骨缺损修复^[13]。因此结合眼眶微环境开发新型的支架材料是眼眶修复的研究方向。

3 眼眶淋巴瘤的发病机制、基因免疫分型和转化研究

眼眶淋巴瘤主要包括黏膜相关性淋巴组织 B 细胞 (B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) 淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)、套细胞淋巴瘤、自然杀伤细胞 T 细胞淋巴瘤和 Burkitt 淋巴瘤^[14],其中 MALT 淋巴瘤占 90% 以上。流行病学资料显示,淋巴瘤的发病与基因突变、病毒感染、放射性物

质接触、免疫缺陷等有关。通过聚合酶链反应、免疫组织化学检测、电子显微镜扫描等检测手段发现,某些地区鹦鹉热衣原体感染与淋巴瘤发生可能有关^[15],由于地区差异的因素,鹦鹉热衣原体感染是否可作为淋巴瘤的独立危险因素仍需要大规模的临床研究加以证实。B 细胞淋巴瘤的发病与癌相关基因 *bcl-6* 等密切相关,*bcl-6* 基因可激活多种下游反应途径,包括 DNA 损伤反应、凋亡反应、浆细胞分化、BCR 信号通路、CD40 信号通路、TNF 信号通路、干扰素信号通路、Toll 样受体信号通路和 WNT 信号通路等,但对于不同类型的淋巴瘤的具体的分子信号通路各不相同,如 NF- κ B 通路主要在 MALT 淋巴瘤的发病中发挥重要作用。这些不同的信号机制是否与淋巴瘤的表型、恶性行为的差异化等有关值得进一步关注。

眼眶的 MALT 淋巴瘤的主要特点之一为惰性生长,其恶性度低,临床表现和组织学特点均易与眼眶反应性淋巴组织增生性疾病和非特异性炎症相混淆。因此,利用基因和分子手段,针对发病的免疫学特点开展 MALT 淋巴瘤的分类和分型研究已成为重点内容。目前已在 MALT 淋巴瘤中发现了多种染色体易位,如 $t(11;18)(q21;q21)$ 、 $t(1;14)(p22;q32)$ 、 $t(14;18)(q32;q21)$ 、 $t(3;14)(p14.1;q32)$ 等^[16],而在 DLBCL 淋巴瘤中 $t(14;18)$ 、 $t(3;14)$ 、 $t(8;14)$ 染色体易位更为多见。根据浆细胞分化程度的不同,不同类型淋巴瘤的免疫表型有所区别,如 MALT 淋巴瘤多见 CD79a(+), CD20(+), BCL2(+), CD43(+/-), DLBCL 淋巴瘤则为 CD10(+), BCL6(+), IRF4/MUM1(+), BCL2(+), cyclin D2(+)^[17]。这些基因水平和分子表型水平的检测有助于发现更多的基因突变和多态性,使肿瘤分型由组织病理学分型精细化为分子生物学分型,从而为临床诊断提供帮助,也便于发现更多的靶分子,为实现临床转化奠定基础。

淋巴瘤是具有免疫特征的主要肿瘤之一,有利于开展免疫靶向分子治疗。利妥昔单抗(美罗华)是具有特异性作用的靶向治疗药物,可以提高系统性淋巴瘤的常规治疗效果,但在眼眶淋巴瘤中的应用效果如何仍缺乏相关临床依据。在国家卫生行业专项项目资助下,我们正在对利妥昔单抗辅助治疗眼眶淋巴瘤的效果和安全性进行前瞻性的多中心随机对照研究,希望通过基于分子靶点研究进展的转化研究来完善我国眼眶淋巴瘤的治疗方案。美国德克萨斯安德森癌症研究中心学者在 2016 年美国眼科年会上报道超低剂量 (4Gy) 与传统常规剂量 (30 ~ 36 Gy) 的放射疗法对 MALT 淋巴瘤的治愈率相当^[18-19],该研究结果还需要

长期随访以及前瞻性的多中心随机对照研究的更强证据进行验证。我国眼眶淋巴瘤患者数量位居全球第一,且绝大多数为生长惰性的 MALT 淋巴瘤,在眼眶淋巴瘤中的比例明显高于美国(90%比 65%)。因此,在我国开展常规剂量和超低剂量放射疗法的前瞻性随机对照研究,对于解决现有放射疗法眼部并发症多、视力损伤比例高的问题具有重要的研究价值和临床意义。

4 眼眶静脉畸形的血管生成和表观遗传研究

眼眶静脉畸形形成的病理基础为血管壁结构的破坏,发生病变的静脉表现为不规则扩张、管壁变薄、血管肌层变薄和/或断裂、中膜平滑肌细胞肥大或萎缩、细胞排列紊乱、管壁纤维间质丰富、纤维细胞纵横交错等组织学形态异常。长期以来,由于缺乏合适的细胞系和动物模型,眼眶静脉畸形的发生机制研究一直无突破性进展。研究发现,多数眼眶静脉畸形标本的血管内皮细胞中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)呈阳性表达。在 2016 年美国眼科年会上,有学者报道 VEGF 的 3 种受体在眼眶静脉畸形的血管内皮细胞中表达均上调,提示抗 VEGF 与其受体组成的信号通路是促进眼眶静脉畸形血管生成的重要因素^[20]。

表观遗传因素在眼部疾病中的研究日益成为热点。眼眶静脉畸形的血流成分、血流动力学特点、组织结构、临床表现均存在较多的遗传和个体差异,提示其发病可能与表观遗传调控机制有关。实际上,在遗传性出血性毛细血管扩张症中,有 42 种长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)存在明显的差异表达^[21],而 lncRNA 正是表观遗传调控过程的主要作用分子。目前对眼眶静脉畸形的 lncRNA 的表达谱进行了检测,鉴定出的一系列显著差异表达的 lncRNA 初步证实了表观遗传调控在眼眶静脉畸形发病中的重要作用,进一步探究其上下游信号分子及其作用机制有望为眼眶静脉畸形的治疗研究提供重要靶点。

参考文献

[1] 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.

[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] 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.

[4] Gillespie EF, Papageorgiou KI, Fernando R, et al. Increased expression of TSH receptor by fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy

leads to chemokine production [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(5): E740-746. DOI:10.1210/jc.2011-2514.

[5] Fang S, Huang Y, Wang S, et al. IL-17A Exacerbates fibrosis by promoting the proinflammatory and profibrotic function of orbital fibroblasts in TAO [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101(8): 2955-2965. DOI: 10.1210/jc.2016-1882.

[6] Salvi M. Immunotherapy for Graves' ophthalmopathy [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2014, 21(5): 409-414. DOI: 10.1097/MED.000000000000097.

[7] Wengert C, Székely G. Intraoperative Imaging and Image-Guided Therapy [M]//Intraoperative Guidance Using 3D Scene Reconstruction from Endoscopic Images. New York: Springer, 2014: 421-438.

[8] Li J, Chen M, Fan X, et al. Recent advances in bioprinting techniques; approaches, applications and future prospects [J/OL]. J Transl Med, 2016, 14: 271 [2016-04-03]. http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles. DOI:10.1186/s12967-016-1028-0.

[9] Zhou H, Xiao C, Wang Y, et al. In vivo efficacy of bone marrow stromal cells coated with beta-tricalcium phosphate for the reconstruction of orbital defects in canines [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(3): 1735-1741. DOI:10.1167/iovs.10-5988.

[10] Xie Q, Wang Z, Zhou H, et al. The role of miR-135-modified adipose-derived mesenchymal stem cells in bone regeneration [J]. Biomaterials, 2016, 75: 279-294. DOI:10.1016/j.biomaterials.2015.10.042.

[11] Egri S, Eczacıoğlu N. Sequential VEGF and BMP-2 releasing PLA-PEG-PLA scaffolds for bone tissue engineering: I. Design and in vitro tests [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2016, 25: 1-9.

[12] Ruan J, Wang X, Yu Z, et al. Enhanced physiochemical and mechanical performance of chitosan-grafted graphene oxide for superior osteoinductivity [J]. Adv Funct Mater, 2016, 26(7): 1085-1097. DOI: 10.1002/adfm.201504141.

[13] Xie Q, Wang Z, Huang Y, et al. Characterization of human ethmoid sinus mucosa derived mesenchymal stem cells (hESMSCs) and the application of hESMSCs cell sheets in bone regeneration [J]. Biomaterials, 2015, 66: 67-82. DOI:10.1016/j.biomaterials.2015.07.013.

[14] Nutting CM, Jenkins CD, Norton AJ, et al. Primary orbital lymphoma [J]. Hematol J, 2002, 3(1): 14-16.

[15] Chanudet E, Zhou Y, Bacon CM, et al. Chlamydia psittaci is variably associated with ocular adnexal MALT lymphoma in different geographical regions [J]. J Pathol, 2006, 209: 344-351.

[16] SE Coupland. Molecular pathology of lymphoma [J]. Eye, 2013, 27(2): 180-189. DOI:10.1038/eye.2012.247.

[17] Isaacson PG. Update on MALT lymphomas. Best practice & research [J]. Clin Haematol, 2005, 18(1): 57-68.

[18] König L, Stade R, Rieber J, et al. Radiotherapy of indolent orbital lymphomas: Two radiation conception [J]. Strahlenther Onkol, 2016, 192(6): 414-4421. DOI:10.1007/s00066-016-0962-3.

[19] Fasola CE, Jones JC, Huang DD, et al. Low-dose radiation therapy (2 Gy x 2) in the treatment of orbital lymphoma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013, 86(5): 930-935. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.04.035.

[20] Atchison EA, Garrity JA, Castillo F, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in benign vascular lesions of the orbit: A case series [J]. Ophthalmology, 2016, 123(1): 209-213. DOI:10.1016/j.ophtha.2015.09.009.

[21] Topping PM, Larsen MJ, Kjeldsen AD, et al. Long non-coding RNA expression profiles in hereditary haemorrhagic telangiectasia [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(3): e90272 [2016-08-03]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090272. DOI:10.1371/journal.pone.0090272.

(收稿日期:2016-10-07)

(本文编辑:尹卫靖)