

· 实验研究 ·

IL-17A 和 IFN- γ 对甲状腺相关眼病患者 CD34⁺ 眼眶成纤维细胞纤维化的作用

鲁奕 黄雅琢 李寅炜 吴钰 方思捷 孙静 周慧芳

上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科 200011

通信作者:周慧芳,Email:fangzzfang@163.com

【摘要】 目的 观察白细胞介素-17A(IL-17A)与 γ 干扰素(IFN- γ)对 Graves 眼病(GO)患者 CD34⁺眼眶成纤维细胞(OFs)的作用,探讨 GO 的发病机制。方法 收集 5 例 GO 患者眼眶减压术中获取的眼眶脂肪结缔组织以及泪腺组织,采用组织块消化法进行培养和传代。采用免疫磁珠富集其中的 CD34⁺ OFs。将培养的 OFs 分为转化生长因子- β (TGF- β)组、TGF- β +10 ng/ml IL-17A 组和 TGF- β +100 ng/ml IL-17A 组、TGF- β +1 ng/ml IFN- γ 组和 TGF- β +5 ng/ml IFN- γ 组,在各组细胞培养液中均添加 5 ng/ml TGF- β 以诱导细胞发生纤维化,按照分组方法分别加入不同质量浓度的 IL-17A 或 IFN- γ 。采用 Western blot 法检测各组眼眶脂肪结缔组织和泪腺组织来源的 CD34⁺ OFs 中纤连蛋白、I 型胶原、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和组织金属基质蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1)等纤维化相关蛋白表达。结果 在眼眶脂肪结缔组织来源的 CD34⁺ OFs 中,TGF- β +100 ng/ml IL-17A 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原、 α -SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量明显高于 TGF- β 组和 TGF- β +10 ng/ml IL-17A 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);TGF- β +5 ng/ml IFN- γ 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原和 α -SMA 相对表达量均明显低于 TGF- β 组和 TGF- β +1 ng/ml IFN- γ 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。在泪腺组织来源的 CD34⁺ OFs 中,TGF- β +100 ng/ml IL-17A 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原、 α -SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量明显高于 TGF- β 组和 TGF- β +10 ng/ml IL-17A 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);TGF- β +1 ng/ml IFN- γ 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原和 TIMP-1 蛋白相对表达量明显高于 TGF- β 组和 TGF- β +5 ng/ml IFN- γ 组,而 α -SMA 蛋白相对表达量明显高于 TGF- β +5 ng/ml IFN- γ 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 高质量浓度 IL-17A 处理可促进 TGF- β 诱导的 CD34⁺ OFs 纤维化,而高质量浓度的 IFN- γ 则抑制 TGF- β 诱导的 CD34⁺ OFs 纤维化。

【关键词】 Graves 眼病;成纤维细胞;转化生长因子- β ;白细胞介素-17A; γ 干扰素;纤维化

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1106100);国家自然科学基金面上项目(81770960);国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(81761168037);上海市科学技术委员会基金项目(17DZ2260100);上海市教委“高水平地方高校建设创新团队”眼肿瘤与眼眶修复协同创新团队(SSMV-ZDCX20180401);上海交通大学医学院附属第九人民医院院级基金项目(JYHL2019MS04)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200719-00513

Effects of IL-17A and IFN- γ on the fibrosis of CD34⁺ orbital fibroblasts in Graves orbitopathy

Lu Yi, Huang Yazhuo, Li Yinwei, Wu Yu, Fang Sijie, Sun Jing, Zhou Hui Fang

Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Corresponding author: Zhou Hui Fang, Email: fangzzfang@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of interleukin-17A (IL-17A) and interferon- γ (IFN- γ) on CD34⁺ orbital fibroblasts (OFs) in patients with Graves ophthalmopathy (GO), and to explore the pathogenesis of GO. **Methods** Orbital adipose connective tissue and lacrimal gland tissue of 5 patients with GO were collected during orbital decompression surgery. These tissue was cultured by tissue explant culture method. CD34⁺ OFs were enriched by immunomagnetic beads after passage and expansion. The cultured cells were divided into transforming growth factor- β (TGF- β) group, TGF- β +10 ng/ml IL-17A group, TGF- β +100 ng/ml IL-17A group, TGF- β +1 ng/ml IFN- γ group and TGF- β +5 ng/ml IFN- γ group. The fibrosis of the cells was induced with 5 ng/ml TGF- β and then

was treated with different concentrations of IL-17A or IFN- γ according to grouping. The expression of fibronectin, collagen type I, α -smooth muscle actin (α -SMA) and tissue metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1) in CD34⁻ OFs derived from both orbital adipose connective tissue and lacrimal gland tissue were detected by Western blot. This study protocol was approved by an Ethic Committee of Shanghai Ninth People's Hospital (SH9H-2020-TK195-1) and written informed consent was obtained from each patient. **Results** For CD34⁻ OFs derived from orbital adipose connective tissue, the relative expressions of fibronectin, type I collagen, α -SMA and TIMP-1 protein were significantly higher in the TGF- β +100 ng/ml IL-17A group than those in the TGF- β group and TGF- β +10 ng/ml IL-17A group (all at $P < 0.05$); the relative expressions of fibronectin, type I collagen and α -SMA in the cells in the TGF- β +5 ng/ml IFN- γ group were significantly lower than those in the TGF- β group and the TGF- β +1 ng/ml IFN- γ group (all at $P < 0.05$). For CD34⁻ OFs derived from lacrimal gland, the relative expressions of fibronectin, type I collagen, α -SMA and TIMP-1 protein in the TGF- β +100 ng/ml IL-17A group were significantly higher than those in the TGF- β group and the TGF- β +10 ng/ml IL-17A group (all at $P < 0.05$); the relative expressions of fibronectin, type I collagen and TIMP-1 protein in the TGF- β +1 ng/ml IFN- γ group were significantly higher than those in the TGF- β group and TGF- β +5 ng/ml IFN- γ group, and the relative expression of α -SMA protein was significantly higher than that in the TGF- β +5 ng/ml IFN- γ group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** High level of IL-17A can promote the fibrosis of TGF- β -induced CD34⁻ OFs, and high level of IFN- γ inhibits the fibrosis of TGF- β -induced CD34⁻ OFs.

[Key words] Graves ophthalmopathy; Fibroblast; Transforming growth factor- β ; Interleukin-17A; Interferon- γ ; Fibrosis

Fund program: National Key Research and Development Plan (2018YFC1106100); National Natural Science Foundation of China (81770960); National Natural Science Foundation of China for International Cooperation and Exchange Program (81761168037); Fund Program of Shanghai Science and Technology Commission (17DZ2260100); Innovative Research Team of High-level Local Universities in Shanghai (SSMV-ZDCX20180401); Hospital-level Foundation of Shanghai Ninth People's Hospital Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYHL2019MS04).

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200719-00513

甲状腺相关眼病 (Graves ophthalmopathy, GO) 是一种由多因素导致的自身免疫性眼眶病, 发病率高, 是 Graves 病最重要和常见的甲状腺外表现^[1]。近年来, 眼外肌纤维化研究逐渐引起关注, 为探讨 GO 的发病机制开辟了新的方向; 而眼眶成纤维细胞 (orbital fibroblasts, OFs) 激活导致的眼外肌和眼眶脂肪纤维化被认为是 GO 发生和发展的关键环节^[2]。研究证实, OFs 是 GO 自身免疫反应的效应细胞, 其表面存在甲状腺刺激激素受体 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR) 及胰岛素样生长因子-1 受体的自身抗原, 与 GO 的发病密切相关^[3]。GO 的主要病理改变为眼眶组织的免疫炎症反应, 疾病的活动期主要表现为眼睑、结膜的充血水肿, 静止期则出现眶内组织的纤维化和脂肪化, 导致眼球运动障碍、斜视和复视。GO 患者眼眶脂肪结缔组织中分别存在着 CD34⁺ OFs 和 CD34⁻ OFs, 这 2 类 OFs 在眼眶纤维化的发生和发展中起着不同的作用, 其中 GO 活动期以 CD34⁺ OFs 的作用为主, 静止期则以 CD34⁻ OFs 的作用为主^[4]。传统观点认为, B 细胞、CD4⁺ Th1 细胞和 CD4⁺ Th2 细胞均参与 GO 眼眶炎症反应^[5], 能较好地解释眼眶水肿的机

制, 但无法解释静止期 GO 发生纤维化和脂肪化病变的原因。最新研究显示, GO 患者球后组织中存在一群高表达白细胞介素 (interleukin, IL)-23 受体的 Th17 细胞, 可同时分泌 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 和 IL-17A 等细胞因子^[6]。本研究探讨 IFN- γ 和 IL-17A 在静止期 GO 眼眶组织发生纤维化改变中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 眼眶组织标本来源 收集上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科确诊为静止期 GO 并行眼眶减压手术共 5 例 5 眼的眼眶脂肪组织和泪腺组织, 患者中男 2 例, 女 3 例; 年龄 28~53 岁; 手术时患者甲状腺功能均恢复正常半年及以上。GO 的诊断参照 Bartley 标准, 眼睑退缩合并以下任意 1 项: (1) 眼球突出; (2) 甲状腺功能异常史; (3) 眼外肌受累。如无上述眼睑退缩则必须具备: (1) 甲状腺功能异常史; (2) 合并有眼球突出、眼外肌受累或视功能障碍之一; (3) 排除其他眼部疾病引起的眼睑退缩、眼球突出和眼球运动障碍。疾病活动性采用临床活动性评分 (clinical

activity score, CAS) 评估, 包括眼睑充血、眼睑水肿、结膜充血、结膜水肿、泪阜红肿、自发性球后疼痛和凝视或眼球活动时疼痛 7 项。每项计 1 分, CAS < 3 分评估为静止期。本研究经上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会批准 (批文号: SH9H-2020-TK195-1), 所有标本供者均知晓本研究目的并自愿签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清、DMEM 正常培养基 (葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)、质量分数 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetra acetic acid, EDTA) 消化液、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS)、青链霉素溶液 (美国 Gibco 公司); I 型胶原酶 (SCR103) (美国 Sigma-Aldrich 公司); HuCD34 MicroBead Kit (130-056-701) (美国 Miltenyi 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 ThermoFisher 公司); 重组人转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) (ab50036)、重组人 IL-17A 蛋白 (ab256041)、重组人 IFN- γ 蛋白 (ab51240)、兔抗人纤连蛋白抗体 (ab32419)、兔抗人 I 型胶原抗体 (ab138492)、兔抗人平滑肌肌动蛋白 α (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (ab32575)、兔抗人组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 抗体 (ab211926) 美国 Abcam 公司; 鼠抗人 β -actin 抗体 (3700T)、马抗鼠 IgG 抗体 (7076S)、山羊抗兔 IgG 抗体 (7074S) (美国 CST 公司); 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 染色试剂盒 (美国 Millipore 公司); 可固定活性染料、Hu CD34 PE-Cy5 流式抗体 (555823) (美国 BD Pharmingen 公司); 固定/破膜液 (美国 eBioscience 公司)。倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司); SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及转印装置、化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); LSRFORTESSA X-20 流式细胞仪 (美国 BD Pharmingen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 OFs 的培养和传代 术中取静止期 GO 眼眶脂肪组织 3~5 ml, 泪腺组织 5 mm×5 mm, 置于生理盐水中, 4 °C 条件下立即转送实验室。采用组织块消化法培养原代细胞, 用 PBS 冲洗组织 3 次, 洗去残余血污, 加入质量分数 0.1% I 型胶原酶的 DMEM, 将组织剪成 1 mm×1 mm 的小块, 37 °C 摇床消化过夜, 离心, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞, 铺于 10 cm 培养皿中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 待细胞长满皿底的 80% 后按 1:3 进行传代。取第 3 或 4 代细胞进行后续实验。

1.2.2 免疫磁珠法富集 CD34⁻ OFs 用含体积分数 1% 胎牛血清与 2 mmol/L EDTA 的 PBS 配置 MACS 缓冲液。用 MACS 缓冲液将 OFs 密度调至 2×10^8 个/ μ l, 体积为 300 μ l, 转入 EP 管中, 加入 200 μ l 混匀的 CD34 免疫磁珠至 EP 管中, 混匀。将 EP 管水平放于冰块之上, 在水平摇床上孵育 30 min, 使磁珠与 CD34⁺ 细胞充分结合。用 MACS 缓冲液重悬细胞, 将磁珠分选柱置于磁力架上, 加入细胞并冲洗 3 次, 磁珠分选柱内为 CD34⁺ OFs, 留下的液体内则为 CD34⁻ 细胞。

1.2.3 流式细胞技术鉴定 CD34⁻ OFs 用含 1% 胎牛血清的 PBS 配置 FACS 缓冲液, 取免疫磁珠富集的 CD34⁻ OFs, 300×g 室温下离心 5 min, 100 μ l FACS 缓冲液重悬, 加入可固定活性染料 0.2 μ l 和 PE-Cy5-CD34 2 μ l, 4 °C 避光孵育 30 min, 破膜固定 45 min, 离心重悬, 用 200 μ l FACS 缓冲液重悬, 4 °C 保存。采用流式细胞仪上样检测, 采用 FlowJoV10 分析结果。

1.2.4 CD34⁻ OFs 的诱导分化 将免疫磁珠分选的 CD34⁻ OFs 重新接种于 6 孔细胞培养板中, 用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液饥饿培养 48 h。将细胞分为空白对照组、TGF- β 组、10 ng/ml IL-17A 组、100 ng/ml IL-17A 组、TGF- β +10 ng/ml IL-17A 组、TGF- β +100 ng/ml IL-17A 组、1 ng/ml IFN- γ 组、5 ng/ml IFN- γ 组、TGF- β +1 ng/ml IFN- γ 组以及 TGF- β +5 ng/ml IFN- γ 组, 按照分组在细胞培养液中加入 TGF- β 5 ng/ml 以及相应质量浓度的 IL-17A 和 IFN- γ , 用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 48 h。

1.2.5 Western blot 法检测 CD34⁻ OFs 中纤维化相关蛋白表达 取诱导处理 48 h 的细胞, 弃去培养基, 预冷 PBS 漂洗 3 次, 每孔加入含 PMSF 和 NaF 的 RIPA 裂解液 80 μ l, 冰上孵育 30 min, 提取各组细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。加入等体积的 2 倍蛋白质凝胶电泳上样缓冲液, 95 °C 加热 10 min 使蛋白变性。根据蛋白定量结果将各组样品加入凝胶孔中, 电泳槽电泳。将电泳分离到的蛋白条带转印至 PVDF 膜上。用质量分数 5% 脱脂奶粉室温摇床上缓慢摇动封闭 1 h。将封闭后的 PVDF 膜放入一抗工作液 (1:1 000) 中, 4 °C 孵育过夜。1 倍 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min; 放入二抗工作液 (1:2 500) 中, 室温下避光, 置于摇床上缓慢摇动孵育 60 min。1 倍 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min; 用 HRP 显色试剂盒显色, 曝光, 采用 Image J 软件对灰度值进行分析。以 β -actin 为内参照, 计算各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计,各组细胞中纤维化相关蛋白相对表达量总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼眶脂肪结缔组织及泪腺组织中 CD34⁺ OFs 比例及细胞形态

流式分析分析结果显示,眼眶脂肪结缔组织中免疫磁珠富集的 CD34⁺ OFs 比例为 $(98.93 \pm 0.40)\%$,泪腺中为 $(98.97 \pm 0.67)\%$ (图 1)。眼眶脂肪结缔组织和泪腺组织来源 CD34⁺ OFs 形态均呈梭形、多角形或扁平星形 (图 2),细胞均贴壁生长。

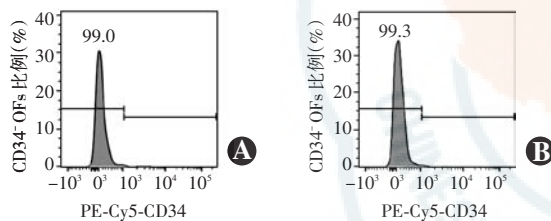


图 1 2 种眼眶组织来源的 CD34⁺ OFs 流式细胞技术鉴定 A:眼眶脂肪结缔组织来源 B:泪腺组织来源 OFs:眼眶成纤维细胞

Figure 1 Flow cytometry analysis of CD34⁺ OFs derived from two different orbital tissue A:orbital adipose connective tissue B:lacrimal gland tissue OFs:orbital fibroblasts

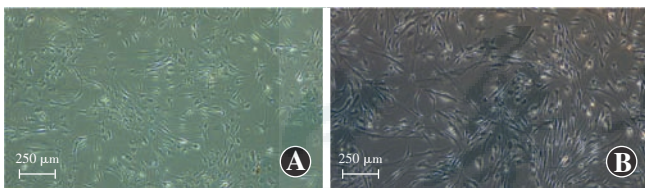


图 2 眼眶脂肪结缔组织和泪腺组织来源 CD34⁺ OFs 形态观察 (标尺 = 250 μm) 细胞均呈梭形、多角形或扁平星形 A:眼眶脂肪结缔组织来源 CD34⁺ OFs B:泪腺组织来源 CD34⁺ OFs

Figure 2 Morphology of CD34⁺ OFs derived from different orbital tissue (scale bar = 250 μm) The cells grew in spindle, polygonal or flat star shape A:CD34⁺ OFs derived from orbital adipose connective tissue B:CD34⁺ OFs derived from lacrimal gland

2.2 不同处理组眼眶脂肪结缔组织 CD34⁺ OFs 中纤维化相关蛋白的表达

Western blot 检测结果显示, TGF-β + 100 ng/ml IL-17A 组和 TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组纤连蛋白、I 型胶原、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白表达条带强于 TGF-β 组,

TGF-β + 5 ng/ml IFN-γ 组纤连蛋白、I 型胶原和 α-SMA 蛋白表达条带明显弱于 TGF-β 组和 TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组。TGF-β 组、TGF-β + 10 ng/ml IL-17A 组和 TGF-β + 100 ng/ml IL-17A 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 20.75, 16.28, 15.12, 38.67$, 均 $P < 0.05$), 其中 TGF-β + 100 ng/ml IL-17A 组细胞中各蛋白相对表达量明显高于 TGF-β 组和 TGF-β + 10 ng/ml IL-17A 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。TGF-β 组、TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组和 TGF-β + 5 ng/ml IFN-γ 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 126.95, 437.49, 27.70, 257.19$, 均 $P < 0.05$), 其中 TGF-β + 5 ng/ml IFN-γ 组细胞 TIMP 蛋白相对表达量高于 TGF-β 组, 纤连蛋白、I 型胶原和 α-SMA 相对表达量均明显低于 TGF-β 组和 TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3, 表 1, 2)。

2.3 不同处理组泪腺组织 CD34⁺ OFs 中纤维化相关蛋白的表达

TGF-β + 100 ng/ml IL-17A 组和 TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组泪腺组织 CD34⁺ OFs 中各蛋白表达条带明显强于 TGF-β 组, TGF-β + 5 ng/ml IFN-γ 组各蛋白表达条带明显弱于 TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组。TGF-β 组、TGF-β + 10 ng/ml IL-17A 组和 TGF-β + 100 ng/ml IL-17A 组泪腺组织 CD34⁺ OFs 中纤连蛋白、I 型胶原、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 34.68, 25.38, 25.01, 94.48$, 均 $P < 0.05$), 其中 TGF-β + 100 ng/ml IL-17A 组细胞中各蛋白相对表达量明显高于 TGF-β 组和 TGF-β + 10 ng/ml IL-17A 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。TGF-β 组、TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组和 TGF-β + 5 ng/ml IFN-γ 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 123.60, 49.72, 33.79, 259.35$, 均 $P < 0.05$); 其中 TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组细胞 α-SMA 蛋白相对表达量与 TGF-β 组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.27$); TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组纤连蛋白、I 型胶原和 TIMP-1 蛋白相对表达量明显高于 TGF-β 组和 TGF-β + 5 ng/ml IFN-γ 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); TGF-β + 5 ng/ml IFN-γ 组细胞中纤连蛋白、I 型胶原、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量均明显低于 TGF-β + 1 ng/ml IFN-γ 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3, 表 1, 2)。

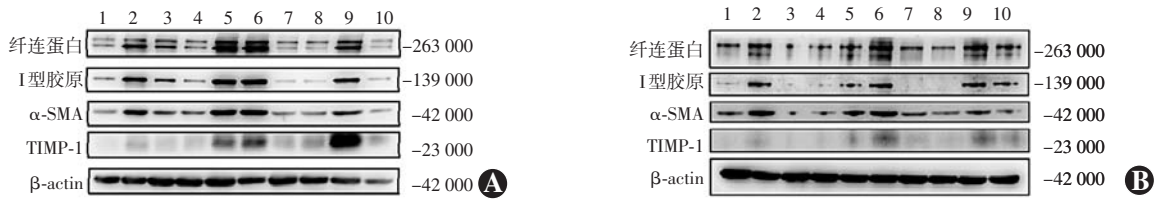


图 3 各组 CD34⁻ OFs 纤维化相关蛋白表达电泳图 A:眼眶脂肪结缔组织来源 CD34⁻ OFs B:泪腺组织来源 CD34⁻ OFs 1:空白对照组;2:TGF-β 组;3:10 ng/ml IL-17A 组;4:100 ng/ml IL-17A 组;5:TGF-β+10 ng/ml IL-17A 组;6:TGF-β+100 ng/ml IL-17A 组;7:1 ng/ml IFN-γ 组;8:5 ng/ml IFN-γ 组;9:TGF-β+1 ng/ml IFN-γ 组;10:TGF-β+5 ng/ml IFN-γ 组;TGF:转化生长因子;α-SMA:α 平滑肌肌动蛋白;TIMP:组织金属基质蛋白酶抑制剂

Figure 3 Electrophoretogram of fibrosis-related proteins in the CD34⁻ OFs A:CD34⁻ OFs derived from orbital adipose connective tissue B:CD34⁻ OFs derived from lacrimal gland 1:blank control group;2:TGF-β group;3:10 ng/ml IL-17A group;4:100 ng/ml IL-17A group;5:TGF-β+10 ng/ml IL-17A group;6:TGF-β+100 ng/ml IL-17A group;7:1 ng/ml IFN-γ group;8:5 ng/ml IFN-γ group;9:TGF-β+1 ng/ml IFN-γ group;10:TGF-β+5 ng/ml IFN-γ group;TGF: transforming growth factor; α-SMA: α-smooth muscle actin; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase

表 1 不同质量浓度 IL-17A 组不同组织来源的 CD34⁻ OFs 纤维化相关蛋白相对表达量比较 (mean±SD)

Table 1 Comparison of fibrosis-related protein expression in CD34⁻ OFs derived from different tissue among different doses of IL-17A groups (mean±SD)

组别	样本量	眼眶脂肪结缔组织				泪腺组织			
		纤连蛋白	I 型胶原	α-SMA	TIMP-1	纤连蛋白	I 型胶原	α-SMA	TIMP-1
TGF-β 组	3	0.82±0.02	1.02±0.06	1.04±0.08	0.27±0.05	0.43±0.02	0.60±0.03	0.69±0.11	0.31±0.05
TGF-β+10 ng/ml IL-17A 组	3	0.83±0.03	1.02±0.08	0.90±0.03 ^a	0.39±0.03 ^a	0.49±0.05	0.56±0.07	0.64±0.04	0.37±0.05
TGF-β+100 ng/ml IL-17A 组	3	1.16±0.12 ^a	1.28±0.05 ^a	1.18±0.07 ^a	0.59±0.06 ^a	0.86±0.11 ^a	0.87±0.07 ^a	1.06±0.07 ^a	0.96±0.09 ^a
F 值		20.75	16.28	15.12	38.67	34.68	25.38	25.01	94.48
P 值		0.002	0.004	0.005	<0.001	0.001	0.001	0.001	<0.001

注:与各自 TGF-β 组比较,^aP<0.05(单因素方差分析,LSD-t 检验) IL-17A:白细胞介素-17A;OFs:眼眶成纤维细胞;α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白;TIMP-1:组织金属蛋白酶抑制剂 1

Note:Compared with the TGF-β group,^aP<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test) IL-17A:interleukin-17A;OFs:orbital fibroblasts;α-SMA:α-smooth muscle actin;TIMP-1:tissue inhibitor of metalloproteinase-1

表 2 不同质量浓度 IFN-γ 组不同组织来源的 CD34⁻ OFs 中纤维化相关蛋白表达量比较 (mean±SD)

Table 2 Comparison of fibrosis-related proteins expression in CD34⁻ OFs derived from different tissue among different doses of IFN-γ groups (mean±SD)

组别	样本量	眼眶脂肪结缔组织				泪腺组织			
		纤连蛋白	I 型胶原	α-SMA	TIMP-1	纤连蛋白	I 型胶原	α-SMA	TIMP-1
TGF-β 组	3	0.82±0.02	1.02±0.06	1.04±0.08	0.24±0.05	0.43±0.02	0.60±0.03	0.69±0.11	0.31±0.05
TGF-β+1 ng/ml IFN-γ 组	3	1.06±0.08 ^a	1.02±0.03	0.93±0.12	1.45±0.11 ^a	0.81±0.06 ^a	1.25±0.11 ^a	0.57±0.04	0.88±0.03 ^a
TGF-β+5 ng/ml IFN-γ 组	3	0.37±0.05 ^a	0.21±0.03 ^a	0.42±0.12 ^a	0.40±0.03 ^a	0.43±0.02	0.70±0.10	0.23±0.03 ^a	0.42±0.02 ^a
F 值		126.95	437.49	27.70	257.19	123.60	49.72	33.79	259.35
P 值		<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001

注:与各自 TGF-β 组比较,^aP<0.05(单因素方差分析,LSD-t 检验) IFN-γ:γ 干扰素;OFs:眼眶成纤维细胞;α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白;TIMP-1:组织金属蛋白酶抑制剂 1

Note:Compared with the TGF-β group,^aP<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test) IFN-γ:interferon-γ;OFs:orbital fibroblasts;α-SMA:α-smooth muscle actin;TIMP-1:tissue inhibitor of metalloproteinase-1

3 讨论

研究表明,无论是 GO 患者还是健康人,人眼眶组织细胞成分均存在异质性,特别是 OFs 亚群,它们可能来源于多种前体细胞^[4]。Bahn^[7] 将这群 OFs 细胞描述为由外周血单核细胞分化而来的 CD34⁺、CXCR4⁺、Collagen I⁺ 纤维细胞,并且最后定居于眼眶。CD34 是一种阶段性白细胞分化抗原,选择性表达于人类造血干细胞、祖细胞和血管内皮细胞,随着细胞的不

断分化、发育和成熟,细胞中 CD34 的表达量逐渐减少,直至消失^[8]。在 GO 患者中,CD34⁺ 和 CD34⁻ OFs 的比例各占约 50%,而健康人眼眶组织中均为 CD34⁻ OFs^[4]。CD34⁺ OFs 比 CD34⁻ OFs 亚群表达更高水平的 TSHR,在甲状腺激素的作用下能够刺激细胞因子,如 IL-6、IL-1β、IL-1RA 和 IL-12 的产生^[4,9],但 CD34⁻ 亚群在 GO 发病中的作用鲜有报道。近年来有研究认为,CD34⁻ OFs 可通过分泌 slit2 来下调 AIRE、Tg 和 TSHR 在纤维细胞上的表达,从而减轻炎症反应,在

GO 静止期起主要作用^[10]。

Th17 细胞是近年来新发现的 CD4⁺ T 细胞亚群,与多种自身免疫性疾病有关^[11-12]。IL-17A 作为 Th17 细胞的效应分子,在 GO 发病中,特别是活动期起到关键作用。GO 患者外周血 Th17 细胞比例和 IL-17A 水平显著升高^[2]。此外,在 CD40L 的帮助下,IL-17A 还可促进 GO 患者 OFs 的水肿和纤维化。Th17 细胞同时还刺激 OFs 的促炎细胞因子(IL-6、IL-8、单核细胞趋化因子-1、肿瘤坏死因子- α 和粒细胞集落刺激因子)和共刺激分子(CD40 和组织相容复合体 II)的表达,调节 OFs 亚群的纤维化和脂肪生成^[13]。另外,有一类病理性 Th17 细胞可同时分泌 IL-17A 和 IFN- γ ,对活动期 GO 眼眶脂肪结缔组织纤维化和脂肪增生起重要作用^[14]。除了眼眶脂肪结缔组织的炎症反应外,GO 患者还会出现严重的干眼症状,影像学表现为泪腺体积增大^[15]。Eckstein 等^[16]发现泪腺腺泡细胞与球后成纤维细胞表面同样表达 TSHR,证实泪腺是 GO 的靶器官之一。研究发现,GO 患者泪腺的大小与患者泪液 IL-17A、IL-1 β 、IL-6 等炎性因子水平的变化呈正相关^[17]。

然而,上述研究并不能很好地解释 GO 的静止期纤维化改变。随着病程延长,GO 进入静止期,临床上可表现为限制性斜视。此外,患者泪腺功能受损及腺体纤维化,干眼症状持续存在,此时眼眶组织中 CD34⁻ OFs 占主导作用^[4]。GO 患者眼眶组织中还存在 B 细胞、Th1、Th2、Th17 细胞等淋巴细胞浸润,其分泌的 IFN- γ 、IL-17A 能否通过 CD34⁻ OFs 参与到静止期纤维化过程中是本研究的重点。

本研究团队在前期研究中发现,IL-17A 可通过 JNK-c-Jun 信号通路促进 TGF 介导的 CD90⁺ OFs 的纤维化^[18]。研究结果显示,高质量浓度的 IL-17A 可以促进 TGF- β 诱导的 CD34⁻ OFs 纤维化,其机制可能也与 Smad 磷酸化以及转录因子 JNK 的激活有关。除了 IL-17A 外,IFN- γ 在 GO 的发病过程中具有重要作用,它主要由 Th1 细胞所分泌,导致眼眶组织的炎症反应和水肿。然而,IFN- γ 除了促炎功能之外还具有抗增生及抗纤维化作用,抑制成纤维细胞的活化并减少胶原合成^[19]。本研究发现,低质量浓度 IFN- γ 能促进泪腺中 CD34⁻ OFs 的纤维化,而高质量浓度的 IFN- γ 则抑制其纤维化相关蛋白的表达。随着 GO 病程的延长,眼眶内局部组织中 IFN- γ 质量浓度随着炎症的缓解逐渐降低,推测眼眶中 IFN- γ 降低也是 GO 静止期发生纤维化的重要原因。

本研究通过细胞功能实验从蛋白水平部分地揭示了静止期 GO 发生纤维化的原因。在眼眶这个特殊的

免疫环境中,眼眶成纤维细胞的异质性为我们提供了新的研究思路。然而,复杂的细胞因子网络对不同亚群成纤维细胞的作用仍不清楚。同时作为效应细胞的成纤维细胞在不同表型状态下究竟发挥了哪些生物学功能,与其他免疫细胞又如何相互作用,仍待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease [J]. N Engl J Med, 2016, 375(16): 1552-1565. DOI: 10.1056/NEJMra1510030.
- [2] 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.
- [3] Taylor PN, Zhang L, Lee R, et al. New insights into the pathogenesis and nonsurgical management of Graves orbitopathy [J]. Nat Rev Endocrinol, 2020, 16(2): 104-116. DOI: 10.1038/s41574-019-0305-4.
- [4] Smith TJ. Potential roles of CD34+ fibrocytes masquerading as orbital fibroblasts in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(2): 581-594. DOI: 10.1210/jc.2018-01493.
- [5] 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.
- [6] Huang Y, Fang S, Li D, et al. The involvement of T cell pathogenesis in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Eye (Lond), 2019, 33(2): 176-182. DOI: 10.1038/s41433-018-0279-9.
- [7] 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.
- [8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- [9] Fernando R, Atkins SJ, Smith TJ. Slit2 may underlie divergent induction by thymotropin of Il-23 and Il-12 in human fibrocytes [J]. J Immunol, 2020, 204(7): 1724-1735. DOI: 10.4049/jimmunol.1900434.
- [10] Fernando R, Grisolia A, Lu Y, et al. Slit2 modulates the inflammatory phenotype of orbit-infiltrating fibrocytes in Graves' disease [J]. J Immunol, 2018, 200(12): 3942-3949. DOI: 10.4049/jimmunol.1800259.
- [11] Isono F, Fujita-Sato S, Ito S. Inhibiting ROR γ t/Th17 axis for autoimmune disorders [J]. Drug Discov Today, 2014, 19(8): 1205-1211. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.04.012.
- [12] Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases [J]. Postepy Dermatol Alergol, 2014, 31(4): 256-261. DOI: 10.5114/pdia.2014.40954.
- [13] Fang S, Huang Y, Liu X, et al. Interaction between CCR6+ Th17 cells and CD34+ fibrocytes promotes inflammation; implications in Graves' orbitopathy in Chinese population [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(6): 2604-2614. DOI: 10.1167/iov.18-24008.
- [14] Fang S, Huang Y, Wang N, et al. Insights into local orbital immunity: evidence for the involvement of the Th17 cell pathway in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(5): 1697-1711. DOI: 10.1210/jc.2018-01626.
- [15] Huh HD, Kim JH, Kim SJ, et al. The change of lacrimal gland volume in Korean patients with thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Korean J Ophthalmol, 2016, 30(5): 319-325. DOI: 10.3341/kjo.2016.30.5.319.
- [16] Eckstein AK, Finkenrath A, Heiligenhaus A, et al. Dry eye syndrome in thyroid-associated ophthalmopathy: lacrimal expression of TSH receptor suggests involvement of TSHR-specific autoantibodies [J]. Acta Ophthalmol Scand, 2004, 82(3 Pt 1): 291-297. DOI: 10.1111/j.1395-3907.2004.00268.x.
- [17] Huang D, Luo Q, Yang H, et al. Changes of lacrimal gland and tear inflammatory cytokines in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8): 4935-4943. DOI: 10.1167/iov.13-13704.
- [18] Fang S, Huang Y, Zhong S, et al. Regulation of orbital fibrosis and adipogenesis by pathogenic Th17 cells in Graves orbitopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017, 102(11): 4273-4283. DOI: 10.1210/jc.2017-01349.
- [19] Poosti F, Bansal R, Yazdani S, et al. Selective delivery of IFN- γ to renal interstitial myofibroblasts: a novel strategy for the treatment of renal fibrosis [J]. FASEB J, 2015, 29(3): 1029-1042. DOI: 10.1096/fj.14-258459.

(收稿日期:2020-07-19 修回日期:2020-10-06)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)