

· 临床研究 ·

胰岛素样生长因子-1 在甲状腺相关眼病患者血清中的变化及其在眼眶脂肪细胞中的表达

王钰娇 何为民

【摘要】 背景 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 参与细胞的分裂、增生、分化或凋亡调控过程, 已证实 Graves 病患者血清 IGF-1 水平升高。甲状腺相关眼病 (TAO) 是 Graves 病在眼部的表现, 眼眶脂肪细胞是甲状腺自身抗原的靶细胞, IGF-1 是否参与 TAO 的发病是研究的方向之一。目的 研究 TAO 患者外周血及眼眶脂肪组织中 IGF-1 的表达变化。方法 采用回顾性研究方法, 纳入 2009 年 8 月至 2014 年 2 月于四川大学华西医院眼科就诊的 TAO 患者 86 例作为 TAO 患者组, 按照临床活动性评分法 (CAS) 及 TAO 严重度分级法进行 TAO 活动度分期, CAS \geq 4 分者 35 例 (活动期组), CAS $<$ 4 分者 51 例 (非活动期组)。同期纳入年龄和性别匹配的眼外伤或白内障患者 86 例作为对照组。采集所有患者肘静脉血 3 ml, 采用 ELISA 法测定血清中 IGF-1 的质量浓度。采集 TAO 患者组中行眼眶减压术-部分眶脂肪切除术的 35 例患者的眼眶脂肪组织作为 TAO 标本组, 同时收集 35 例眼眶良性肿瘤或眼眶脂肪脱垂患者的眼眶脂肪组织作为标本对照组。将眼眶脂肪组织制备组织切片, 分别行组织病理学检查和免疫组织化学染色, 观察 TAO 患者眼眶脂肪组织的病理学特征, 检测眼眶脂肪组织中 IGF-1 的表达情况。结果 TAO 患者组和对照组外周血 IGF-1 质量浓度分别为 (0.862 \pm 0.026) ng/ml 和 (0.767 \pm 0.480) ng/ml, TAO 患者组患者外周血 IGF-1 质量浓度高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P=0.281$)。TAO 患者活动期组和非活动期组血清 IGF-1 质量浓度分别为 (0.877 \pm 0.355) ng/ml 和 (0.803 \pm 0.031) ng/ml, 组间比较差异无统计学意义 ($P=0.834$)。免疫组织化学检测可见 IGF-1 主要表达于脂肪细胞膜和细胞质, TAO 标本组可见 IGF-1 表达呈深褐色着色, 细胞强阳性率为 74.29%, 标本对照组为浅棕色着色, 细胞强阳性率为 45.46%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.289, P=0.021$)。结论 TAO 患者外周血中 IGF-1 水平并无明显升高, 且患者外周血中 IGF-1 水平的改变与病变程度无明显关联。IGF-1 在局部眼眶脂肪组织中表达量明显增加, 可能与患者眼眶脂肪组织的增生有关。

【关键词】 自身免疫疾病; 胰岛素样生长因子-1; 人; 甲状腺相关眼病

Serum insulin-like growth factor-1 level and its expression in orbital adipose tissue in TAO patients Wang Yujiao, He Weimin. Department of Ophthalmology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China Corresponding author: He Weimin, Email: heweimin888@hotmail.com

【Abstract】 **Background** Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) participates in the regulation of the biological activity of cells. Researches showed that the serum IGF-1 level is significantly raised in the patients with Graves diseases. Thyroid associated ophthalmopathy (TAO) is one of Graves diseases, and orbital adipose cells are the target cells of thyroid autoantigens. However, whether IGF-1 is associated with TAO is still unclear. **Objective** This study was to investigate the expressions of IGF-1 in both circulating blood and orbital adipose tissue in TAO patients.

Methods A retrospective cohort study was performed. Eighty-six TAO patients were enrolled in West China Hospital of Sichuan University from August 2009 to February 2014. According to the clinical activity score criteria (CAS), the patients were divided into active stage (CAS \geq 4, 35 patients) and inactive stage (CAS $<$ 4, 51 patients). Eighty-six health adult persons were enrolled as the controls. The periphery blood of 3 ml was collected from each subject to detect the serum IGF-1 level by ELISA. Orbital adipose tissues were obtained during the surgery from 35 TAO patients and 35 patients with benign orbital tumor or orbital adipose prolapse from August 2009 to February 2014. The histopathological examination of orbital adipose tissue was carried out to evaluate the pathological characteristics, and

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.015

基金项目:四川省科技厅计划支撑项目(2013SZ0029)

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院眼科

通信作者:何为民, Email: heweimin888@hotmail.com

the expression of IGF-1 in orbital adipose tissue was assessed by immunohistochemistry. This study protocol was approved by Ethic Committee of West China Hospital of Sichuan University, and informed consent was obtained from each subject before entering the cohort. **Results** The mean serum IGF-1 level was (0.862 ± 0.026) ng/ml in the TAO patients, and that in the normal controls was (0.767 ± 0.480) ng/ml, without significant difference between them ($P=0.281$). The mean serum IGF-1 level was (0.877 ± 0.355) ng/ml and (0.803 ± 0.031) ng/ml in active stage and inactive stage of patients, respectively, and no significant difference was found between them ($P=0.834$). IGF-1 expression located in cellular membrane and cytoplasm. The expressing intensity of IGF-1 in orbital adipocytes was significantly enhanced in the TAO patients with the positive rate of 74.29%, and that in the controls was 45.46%, showing a statistical difference between the two groups ($\chi^2=5.289, P=0.021$). **Conclusions** Serum IGF-1 level does not rise in TAO patients, but the expression of IGF-1 in orbital adipocytes up-regulates, indicating that mature orbital adipocytes of TAO are regulated mainly by IGF-1.

[Key words] Autoimmune diseases/metabolism; Insulin-like growth factor-1; Humans; Thyroid-associated ophthalmopathy

甲状腺相关眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO)又称为 Graves 眼病,是与 Graves 病有关联但又相对独立的器官特异性自身免疫性疾病,在 Graves 病患者中发生率为 25%~50%^[1],严重影响患者的视觉功能和生活质量。TAO 的发病机制仍不完全明确,目前认为 TAO 患者甲状腺与眼眶组织存在共同抗原,刺激机体产生自身抗体,引起甲状腺和眼眶组织自身免疫炎症反应,造成组织损伤与重塑,从而出现甲状腺及眼眶组织的特异病变。由于缺乏理想的动物模型,目前的研究主要依赖于眼眶成纤维细胞(orbital fibroblasts, OFs)作为自身抗原的靶细胞和效应细胞^[2],但 OFs 获得相对比较困难。眼眶脂肪细胞来源较易,理论上是理想的自身抗原的靶细胞。胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)是一种多肽类物质,能与 IGF-1 受体(IGF-1 receptor, IGF-1R)特异性结合,具有促进细胞有丝分裂、细胞分化和抗细胞凋亡等作用^[3]。研究发现 Graves 病患者外周血中 IGF-1 水平升高^[4-5],而 TAO 患者外周血中 IGF-1 含量是否升高及其与疾病的活动度是否有关尚不清楚。另外,TAO 患者眼眶脂肪组织中 IGF-1 的定位尚未明确。本研究中检测 TAO 患者外周血和眼眶脂肪组织中 IGF-1 的表达,探讨 IGF-1 在 TAO 发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 一般资料 采用回顾性研究设计。纳入 2009 年 8 月至 2014 年 2 月于四川大学华西医院就诊的 TAO 患者 86 例。纳入标准:(1)按照文献[6]和[7]的标准,依据临床表现、实验室检查及眼眶 CT 等确诊的 TAO 患者。(2)甲状腺功能正常 2 个月以上。排除标准:凝血功能障碍者、糖尿病患者、肝功能异常者及其他眼眶疾病患者。根据临床活动性评分法(clinical

activity score, CAS)及 TAO 严重度分级法^[8-9]进行 TAO 活动度分期和分级。TAO 患者组包括男 46 例,女 40 例;年龄 26~64 岁,平均 43.5 岁;患者的病变严重度为 II~V 度;CAS ≥ 4 分者 35 例,为活动期,CAS < 4 分者 51 例,为非活动期。另同期纳入 86 例眼外伤或白内障患者作为对照组,年龄 26~65 岁,性别和年龄与 TAO 患者组匹配。

收集 TAO 患者组中行眼眶减压术-部分眶脂肪切除术的 35 例患者的眼眶脂肪组织作为 TAO 标本组,其中男 15 例,女 20 例;年龄 30~58 岁;TAO 严重度均为 IV~V 级;CAS < 4 。同期收集 35 例因眼眶良性肿瘤或眶脂肪脱垂而手术切除的眼眶脂肪组织作为标本对照组,其中男 19 例,女 16 例;年龄 32~65 岁。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 IGF-1 多克隆抗体(编号:ab9572,英国 Abcam 公司);二抗为抗兔/鼠通用型免疫组织化学检测试剂盒(编号:GK500705,上海基因科技有限公司);IGF-1 ELISA 试剂盒(编号:CSB-E13766h,武汉华美生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 患者血清中 IGF-1 质量浓度的检测 为避免昼夜节律对 IGF-1 产生影响,所有患者于 9:00~10:00 空腹采集肘静脉血 3 ml,离心后收集血清,储存于-20℃冰箱中。IGF-1 ELISA 试剂盒检测范围为 0.312~20.000 ng/ml,按说明书进行操作,检测患者血清 IGF-1 的质量浓度。

1.2.2 眼眶脂肪组织中 IGF-1 蛋白的检测 从 TAO 标本组和标本对照组收集的各 35 份眼眶脂肪组织标本中,每个标本分为 2 个部分,一部分经体积分数 10% 甲醛固定 24 h,石蜡包埋,厚 5 μ m 连续切片,行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察。另一部分标本制备切片行常规免疫组织化学检测。常规脱蜡、水化组织切片,pH 6.0 的枸橼酸钠修复液 95℃水浴修复

40 min, 阻断过氧化物酶后 PBS 冲洗 3 次, 避光孵育 15 min, 分别于滴加一抗, PBS 再冲洗 3 次, 37 °C 孵育 45 min, 二抗系统处理经 DAB 显色, 苏木素复染, 脱水并封片。400 倍光学显微镜下观察组织中 IGF-1 蛋白的表达, 以细胞核、细胞膜和细胞质内出现棕褐色染色为阳性反应, 计数 5 个视野中细胞着色程度及着色细胞比例。参照文献[10]和[11]的标准对阳性反应进行判断: 细胞着色淡或无着色/阳性细胞比例 < 25% 者为阴性(-); 细胞出现淡棕色染色/阳性细胞比例为 25% ~ 50% 者为弱阳性(+); 细胞出现棕色染色/阳性细胞比例为 50% ~ 75% 者为中度阳性(++); 细胞深褐色着色/阳性细胞比例 > 75% 者为强阳性(+++)。记录 2 个组中强阳性例数占总例数的百分比。阳性对照来自肝癌组织, PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。血清 IGF-1 质量浓度的测定数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用均衡分组两水平试验设计, TAO 患者组与对照组或活动期与非活动期组患者血清 IGF-1 质量浓度的差异比较均采用独立样本 *t* 检验; 眼眶脂肪组织中 IGF-1 的表达以率表示, TAO 标本组与标本对照组间眼眶脂肪组织中 IGF-1 的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者血清 IGF-1 质量浓度的比较

TAO 患者组与对照组血清 IGF-1 质量浓度比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.281$) (表 1)。TAO 患者组中活动期与非活动期患者之间血清 IGF-1 质量浓度的差异无统计学意义 ($P = 0.834$) (表 2)。

表 1 TAO 患者组与对照组血清 IGF-1 质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	例数	IGF-1 质量浓度
TAO 患者组	86	0.862 ± 0.026
对照组	86	0.767 ± 0.480
<i>P</i>		0.281

注: TAO: 甲状腺相关眼病; IGF: 胰岛素样生长因子 (独立样本 *t* 检验)

表 2 活动期与非活动期 TAO 患者血清 IGF-1 质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	例数	IGF-1 质量浓度
活动期组	35	0.877 ± 0.355
非活动期组	51	0.803 ± 0.031
<i>P</i>		0.834

注: TAO: 甲状腺相关眼病; IGF: 胰岛素样生长因子 (独立样本 *t* 检验)

2.2 TAO 患者眼眶脂肪组织的病理学表现

TAO 标本组可见眼眶脂肪组织明显增生, 脂肪细胞增多, 排列拥挤; 细胞呈卵圆形, 细胞质内含大脂滴, 因脂质溶解而呈空泡状, 脂滴外周的基膜复合体 (为薄层细胞质并与细胞膜外的薄层胶原纤维紧贴形成) 增厚, 细胞核被脂滴推挤至细胞一侧, 呈扁平状 (图 1)。

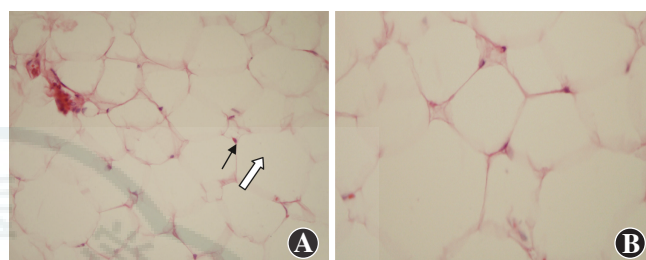


图 1 眼眶脂肪组织切片的组织病理学观察 (HE ×400) A: TAO 标本组眼眶脂肪组织细胞呈卵圆形, 体积小, 细胞质内脂质溶解呈空泡状 (白箭头), 扁平状细胞核位于细胞一侧 (黑箭头) B: 对照组眼眶脂肪组织细胞体积大, 细胞质呈大空泡, 细胞核位于细胞一侧

2.3 眼眶脂肪组织中 IGF-1 的表达

TAO 标本组脂肪细胞的细胞膜 (基膜复合体) 中可见棕褐色染色, IGF-1 主要在脂肪细胞的细胞膜及细胞质中表达; 标本对照组脂肪细胞的细胞膜和细胞质呈淡棕色染色 (图 2)。TAO 标本组眼眶脂肪细胞中 IGF-1 的强阳性表达率明显高于标本对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3)。

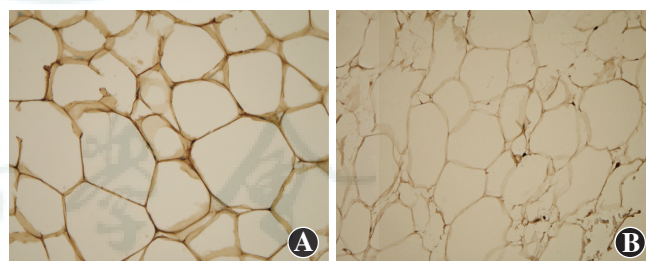


图 2 TAO 标本组和标本对照组眼眶脂肪组织中 IGF-1 的表达 (DAB ×400) A: TAO 标本组眼眶脂肪组织细胞基膜复合体上 IGF-1 强阳性表达, 呈棕褐色染色 B: 标本对照组眼眶脂肪组织细胞中 IGF-1 呈弱阳性表达

表 3 TAO 标本组与对照标本组 IGF-1 强阳性表达率比较 (n/%)

组别	例数	IGF-1 强阳性例数
TAO 标本组	35	26/74.29
标本对照组	35	15/45.46
χ^2		5.289
<i>P</i>		0.021

注: TAO: 甲状腺相关眼病; IGF: 胰岛素样生长因子 (χ^2 检验)

3 讨论

3.1 TAO 的组织病理学特点

TAO 主要表现为自身免疫性的眼眶炎症改变, 常导致患者单眼或双眼突出, 其主要病理过程为眼眶脂肪结缔组织和眼外肌中的炎症反应、脂肪增生和糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 沉积, 后者主要成分是透明质酸。目前认为 OFs 作为前脂细胞表面的某种抗原, 在多因素作用下被自身反应性 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞识别, 引起自身免疫反应。大量炎性细胞在眼眶组织中聚集并释放细胞因子, 促使 OFs 增生并分泌大量 GAG 并结合大量水分, 导致眼眶脂肪组织及眼外肌间质水肿; 同时 OFs 增生分化为脂肪细胞, 进而形成 TAO 的特异性临床表现^[12-13]。

3.2 IGF-1 在 TAO 形成中的作用

IGF-1 可特异性地与 IGF-1R 结合并活化 PI3K 信号通路, 上调过氧化物酶体增生物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors gamma, PPAR γ), 促进 2 种 T 淋巴细胞趋化因子白细胞介素-16 和受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor, RANTES) 的表达, 引发免疫反应^[14-17], 并使 T 淋巴细胞大量增生, 释放大量的炎性介质, 激活 OFs 向成熟脂肪细胞转变, 促进脂肪生成及分泌大量 GAG^[18-19], 导致 TAO, 提示 IGF-1 及 IGF-1R 是 TAO 眼眶脂肪间充质干细胞增生和脂肪生成的启动因子, 但鲜有研究表明脂肪细胞增生是否在 TAO 的发病过程中发挥作用。Krassas 等^[20]研究证实, 处于不同程度及不同活动期的 TAO 患者外周血中 IGF-1 水平与正常人比较差异无统计学意义, 但该研究并未包含非活动期 TAO 患者。本研究结果也证实, TAO 患者外周血中 IGF-1 水平与对照组比较差异无统计学意义, 且与 TAO 活动度无关联。本研究中免疫组织化学检测显示, IGF-1 在非活动期 TAO 患者眼眶脂肪细胞膜及细胞质中呈高表达, 而 Matos 等^[21]用相同方法检测到 IGF-1 在 TAO 患者 OFs 上表达阳性, 并与疾病的活动程度呈正相关, 这表明 IGF-1 在外周血与局部眼眶脂肪组织中的表达是相对独立的。IGF-1 在 TAO 患者眼眶脂肪组织中可能来源于旁分泌或者自分泌, 作用于成纤维细胞和脂肪细胞, 并可能与脂肪细胞增生及成熟的整个过程密切相关。本研究中仅检测 IGF-1 及其受体在脂肪细胞上的定位, 其具体的信号传导机制还需进一步研究。

参考文献

[1] Bahn RS. Graves' ophthalmopathy[J]. N Engl J Med, 2010, 362(8):

726-738. doi:10.1056/NEJMra0905750.

- [2] Smith TJ. Potential role for bone marrow-derived fibrocytes in the orbital fibroblast heterogeneity associated with thyroid-associated ophthalmopathy[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 162(1): 24-31. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04219.x.
- [3] Ullrich A, Gray A, Tam AW, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity[J]. EMBO J, 1986, 5(10): 2503-2512.
- [4] Bahn RS. Cytokines in thyroid eye disease: potential for anticytokine therapy[J]. Thyroid, 1998, 8(5): 415-418. doi:10.1089/thy.1998.8.415.
- [5] Smith TJ. Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? [J]. Pharmacol Rev, 2010, 62(2): 199-236. doi:10.1124/pr.109.002469.
- [6] 罗清礼. 甲状腺相关眼病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 192-195.
- [7] Bartley GB, Coman CA. Diagnostic criteria for Graves' ophthalmopathy[J]. Am J Ophthalmol, 1995, 119(6): 792-795. doi:10.1016/S0002-9394(14)72787-4.
- [8] 宋国祥. 眼眶病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 342.
- [9] Van Dyke HJL. Orbital Graves' disease. a modification of the "no specs" classification[J]. Ophthalmology, 1981, 88(6): 479-483. doi: 10.1016/S01616420(81)34998-7.
- [10] 成磊, 王琼, 雷松, 等. 豚鼠眶周注射曲安奈德/透明质酸酶后的病理变化[J]. 四川大学学报: 医学版, 2012, 43(5): 690-693.
- [11] 刘旭明, 何建方. 现代诊断病理学[M]. 广州: 中山大学出版社, 2006: 59.
- [12] Douglas RS, Gupta S. The pathophysiology of thyroid eye disease: implications for immunotherapy[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2011, 22(5): 385-390. doi:10.1097/ICU.0b013e3283499446.
- [13] 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.
- [14] 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. doi:10.4049/jimmunol.170.12.6348.
- [15] Smith TJ. The putative role of fibroblasts in the pathogenesis of Graves' disease: evidence for the involvement of the insulin-like growth factor-1 receptor in fibroblast activation[J]. Autoimmunity, 2003, 36(6-7): 409-415. doi:10.1080/08916930310001603000.
- [16] Smith TJ, Hoa N. Immunoglobulins from patients with Graves' disease induce hyaluronan synthesis in their orbital fibroblasts through the self-antigen, insulin-like growth factor-I receptor[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(10): 5076-5080. doi:10.1210/jc.2004-0716.
- [17] Gianoukakis AG, Douglas RS, King CS, et al. Immunoglobulin G from patients with Graves' disease induces interleukin-16 and RANTES expression in cultured human thyrocytes: a putative mechanism for T-cell infiltration of the thyroid in autoimmune disease[J]. Endocrinology, 2006, 147(4): 1941-1949. doi:10.1210/en.2005-1375.
- [18] Zhao P, Deng Y, Gu P, et al. Insulin-like growth factor I promotes the proliferation and adipogenesis of orbital adipose-derived stromal cells in thyroid-associated ophthalmopathy[J]. Exp Eye Res, 2013, 107: 65-73. doi:10.1016/j.exer.2012.11.014.
- [19] Khoo TK, Bahn RS. Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of autoantibodies[J]. Thyroid, 2007, 17(10): 1013-1018. doi:10.1089/thy.2007.0185.
- [20] Krassas GE, Pontikides N, Kaltsas T, et al. A free and total insulin-like growth factor (IGF) - I, -II, and IGF binding protein-1, -2, and -3 serum levels in patients with active thyroid eye disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(1): 132-135. doi:10.1210/jc.2002-021349.
- [21] Matos K, Manso PG, Marback E, et al. Protein expression of VEGF, IGF-1 and FGF in retroocular connective tissues and clinical correlation in Graves' ophthalmopathy[J]. Arq Bras Oftalmol, 2008, 71(4): 486-492. doi:10.1590/S0004-27492008000400004.

(收稿日期: 2015-06-23)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)