

肿瘤坏死因子 α 对甲状腺相关眼病眼眶成纤维细胞的去分化作用及调控机制

井雅朋 黄晓明 吴桐 简天明 史双双 赵亮 孙丰源 唐东润

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光医院 天津医科大学眼科研究所, 天津 300384

通信作者: 唐东润, Email: tangdr62@126.com

【摘要】 **目的** 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 对甲状腺相关眼病 (TAO) 眼眶成纤维细胞 (OF) 分化的影响及其机制。 **方法** 收集 2019 年 12 月至 2020 年 8 月在天津医科大学眼科医院诊断为 TAO 且拟行眼眶减压术的患者 6 例 6 眼, 术中收集眼眶脂肪结缔组织, 组织块培养法分离培养 OF 并进行波形蛋白免疫荧光鉴定。诱导 OF 成脂分化并油红 O 染色鉴定。分别采用含 0、0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 的完全培养液诱导眼眶成熟脂肪细胞去分化。分别收集原代、分化 14 d 和去分化 20 d 细胞, 通过实时荧光定量 PCR 检测过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ)、细胞外调节蛋白激酶 1 (ERK1)、ERK2 及脂肪包被蛋白 1 (perilipin1) mRNA 相对表达量; 采用 Western blot 法检测 PPAR γ 、P-ERK1/2、perilipin1 蛋白相对表达量。 **结果** 体外成功培养人 TAO 来源 OF, 细胞呈梭形或多角形, 呈旋涡状紧密排列, 波形蛋白免疫荧光染色呈阳性。OF 成脂分化诱导后, 部分细胞的细胞质中可出现脂滴样结构, 油红 O 染色可见细胞质内被着染的脂滴结构, 证实分化后得到细胞为脂肪细胞。0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 诱导脂肪细胞发生去分化, 且随诱导时间的延长, 细胞质中的脂滴体积缩小, 含脂滴细胞数量也逐渐减少, 并在去分化 20 d 胞质内脂滴基本消失, 细胞变为长梭形, 紧密排列, 去分化为成纤维样细胞。实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 分化 14 d 组细胞 PPAR γ 、ERK1、ERK2、perilipin1 mRNA 相对表达量分别为 4.26 ± 0.09 、 2.01 ± 0.09 、 3.23 ± 0.10 和 8.69 ± 0.33 , 明显高于原代组的 1.00 ± 0.09 、 1.05 ± 0.19 、 1.00 ± 0.10 和 1.05 ± 0.07 以及去分化 20 d 组的 1.06 ± 0.03 、 1.15 ± 0.11 和 6.27 ± 0.09 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示, 分化 14 d 组 PPAR γ 、ERK1/2、perilipin1 蛋白表达量分别为 1.07 ± 0.03 、 1.00 ± 0.03 和 1.13 ± 0.02 , 明显高于原代组的 0.37 ± 0.02 、 0.29 ± 0.02 和 0.00 ± 0.00 以及去分化 20 d 组的 0.20 ± 0.02 、 0.38 ± 0.06 和 0.00 ± 0.00 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。 **结论** TNF- α 对 TAO 眼眶脂肪细胞有去分化作用, 其机制可能与下调 ERK1/2-PPAR γ -perilipin1 信号通路有关。

【关键词】 甲状腺相关眼病; 眼眶成纤维细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 去分化; 过氧化物酶体增殖激活受体 γ

基金项目: 天津市临床重点学科 (专科) 建设项目 (TJLCZDXKT005)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210119-00051

Dedifferentiation and regulation mechanism of TNF- α on orbital fibroblasts in thyroid-associated ophthalmopathy

Jing Yapeng, Huang Xiaoming, Wu Tong, Jian Tianming, Shi Shuangshuang, Zhao Liang, Sun Fengyuan, Tang Dongrun

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, Tianjin Medical University School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Tang Dongrun, Email: tangdr62@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the differentiation of orbital fibroblasts (OF) in thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) and its regulation mechanism. **Methods** Six patients (six eyes) diagnosed with TAO were collected in Tianjin Medical University Eye Hospital from December 2019 to August 2020. Adipose connective tissue was collected during the orbital decompression surgery. OF was isolated and cultured using the tissue block method and vimentin was identified by immunofluorescence. Lipogenic differentiation of OF was induced and identified by oil red O staining. Complete culture medium containing 0, 0.1, 1.0 and 10.0 $\mu\text{g/L}$ TNF- α was used to induce the dedifferentiation of orbital mature adipocytes. Primary culturing cells, 14-day differentiation cells and 20-day dedifferentiation cells were collected. The relative mRNA expression levels of

peroxisomal proliferation-activated receptor (PPAR γ), extracellular regulatory protein kinase1 (ERK1), ERK2 and fat-coated protein1 (perilipin1) were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The relative protein expression levels of PPAR γ , P-ERK1/2 and perilipin1 were detected by Western blot. **Results** Human TAO-derived OF were successfully cultured *in vitro*, spindle-shaped or polygonal, tightly arranged in a vortex pattern, and immunofluorescence staining for vimentin was positive. After OF adipogenic differentiation, lipid droplet structures could be seen in the cytoplasm of some cells, and the stained lipid droplet structures in the cytoplasm could be seen by oil red O staining, which confirmed that the cells obtained after differentiation were adipocytes. Dedifferentiation of adipocytes was induced by 0.1, 1.0, and 10.0 $\mu\text{g/L}$ TNF- α . With the extension of induction time, the volume of lipid droplets in the cytoplasm and the number of cells containing lipid droplets decreased. Lipid droplets disappeared in the cytoplasm on the 20th day of dedifferentiation, and the cells became long spindle-shaped and tightly arranged, dedifferentiated into fibroblast-like cells. Real-time fluorescence quantitative PCR detection results showed that the relative expression levels of PPAR γ , ERK1, ERK2 and perilipin1 mRNA in 14-day differentiation group were 4.26 ± 0.09 , 2.01 ± 0.09 , 3.23 ± 0.10 and 8.69 ± 0.33 , respectively, which were significantly higher than 1.00 ± 0.09 , 1.05 ± 0.19 , 1.00 ± 0.10 and 1.05 ± 0.07 in primary group, and 1.06 ± 0.03 , 1.15 ± 0.11 and 6.27 ± 0.09 in 20-day dedifferentiation group (all at $P < 0.05$). Western blot analysis showed that the expression levels of PPAR γ , ERK1/2 and perilipin1 proteins in 14-day differentiation group were 1.07 ± 0.03 , 1.00 ± 0.03 and 1.13 ± 0.02 , respectively, which were significantly higher than 0.37 ± 0.02 , 0.29 ± 0.02 and 0.00 ± 0.00 in primary group, and 0.20 ± 0.02 , 0.38 ± 0.06 and 0.00 ± 0.00 in 20-day dedifferentiation group (all at $P < 0.001$). **Conclusions** TNF- α has a dedifferentiation effect on TAO orbital adipocytes. The mechanism may be related to the downregulation of ERK1/2-PPAR γ -perilipin1 signaling pathway.

[Key words] Thyroid-associated ophthalmopathy; Orbital fibroblasts; Tumor necrosis factor- α ; Dedifferentiation; PPAR γ

Fund program: Tianjin Key Clinical Discipline Construction Project (TJLCZDXKT005)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210119-00051

甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是以眶脂肪增生和眼外肌纤维化为特征的自身免疫性疾病,与 Graves 病(Graves disease, GD)密切相关^[1]。TAO 的发病机制主要涉及眼眶成纤维细胞(orbital fibroblast, OF)向脂肪细胞及肌纤维母细胞的分化^[2]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)作为 T 淋巴细胞、巨噬细胞等分泌的特异性细胞因子之一,与其他细胞因子,如白细胞介素 6、 γ 干扰素等的相互作用在 TAO 患者眼眶组织改变过程中发挥重要作用^[3]。虽然已有研究深入探讨了 TNF- α 增加人、大鼠和小鼠 3T3-L1 脂肪细胞的脂解作用以及药物对 TAO 脂肪细胞分化的抑制作用^[4-8],但在 TAO 中, TNF- α 致眼眶脂肪细胞的去分化作用鲜有报道。通过 KEGG PATHWAY Database 网站查询可知脂肪细胞成脂分化过程中发挥关键作用的分子信号通路为 ERK1/2-PPAR γ -perilipin1,且已有研究发现 TNF- α 可以通过影响 PPAR γ 的表达来发挥抑制脂肪细胞分化的作用^[8]。因此,推测 TNF- α 可能直接通过影响脂肪分化信号通路进而发挥其抑制脂肪细胞分化的作用。本研究通过观察人 OF 在 TNF- α 诱导过程中的形态学以及功能的变化,以明确 TNF- α 是否促进 TAO 患者 OF 来源的脂肪细胞去分化以及其通路机制,为寻找调

控 TAO 发病的作用靶点提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本来源 收集 2019 年 12 月至 2020 年 8 月在天津医科大学眼科医院行眼眶减压术的 TAO 患者 6 例 6 眼术中眼眶脂肪组织,年龄 20~50 岁,平均 35 岁。纳入标准:患者 T3、T4、促甲状腺激素等指标正常,并稳定半年以上,病情稳定期眼球突出影响外观,出现严重眼表并发症,视神经受压,视力急剧下降,除甲状腺功能异常外无其他病史,病程 1~2 年。本研究方案经天津医科大学眼科医院伦理委员会批准[批文号:2019KY(L)-29],所有受试者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)、胎牛血清、青链霉素双抗、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);胰岛素、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)(美国 MCE 公司);细胞组织 RNA 提取试剂盒(美国 EZB 公司);兔抗 P44/42 MAPK(ERK1/2)单克隆抗体(137F5)、兔抗 Phospho44/42MAPK(ERK1/2)单克隆抗体(Thr202/Tyr204)、



兔抗 PPAR γ 单克隆抗体(C26H12)、兔抗 perilipin1 单克隆抗体(D1D8)、兔抗波形蛋白抗体(ab128507)(美国 Cell Signaling Technology 公司);山羊抗兔 IgG 抗体(英国 Abcam 公司);牛血清蛋白、Fraction V(上海碧云天生物科技有限公司);2 倍浓缩 RT-PCR 扩增混合液、逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪有限公司);油红 O 染色液(细胞专用)试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司)。7900HTFAST Q-PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);微量分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 OF 的原代培养 将 TAO 患者眼眶脂肪结缔组织浸泡在 PBS 中充分洗涤,去除肉眼可见的血管组织,切取纯净脂肪组织,剪成 0.5~1 mm³ 大小均匀的颗粒,加入适量 PBS,离心半径 10 cm,1 000 r/min 离心 10 min。取上层纯脂肪颗粒,轻轻地铺在干燥的 25 cm² 培养瓶底壁上,放入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内静置 40 min,待脂肪颗粒黏附牢固后缓慢加入含 20% 血清的 DMEM 培养液 1~2 ml,常规 CO₂ 孵箱内培养 4 d;更换培养液至 5 ml,继续常规培养,取生长良好的细胞进行后续实验。

1.2.2 体外培养 OF 的免疫荧光鉴定 取生长状态良好的细胞,用 0.25% 胰蛋白酶液消化,制成单细胞悬液,接种到预先放置 6 mm×22 mm 盖玻片的培养瓶或培养皿(直径 35 mm)中,置 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱培养 1~3 d;待细胞接近单层融合,取出盖玻片,浸入 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗 2 次,4% 多聚甲醛室温固定 40 min。将细胞玻片放入盖片染色缸,置于 PBS 中振荡洗涤 5 min,取出吹干,滴加抗波形蛋白抗体(1:500 稀释),置湿盒内避光 37 °C 孵育 60 min 或 4 °C 冰箱中过夜;置于 PBS 中振荡洗涤 3 次,每次 5 min,吹干,滴加荧光素标记二抗(1:100 稀释),在湿盒中 37 °C 保温 60 min;置于 PBS 中振荡洗涤 2 次,每次 5 min,然后用蒸馏水振荡洗涤 1 次;50% 缓冲甘油封片,暗室荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 体外培养 OF 的成脂分化及鉴定 取生长状态良好的 OF,胰蛋白酶消化后调整细胞密度为 5×10⁴/ml 并接种于 6 孔板中,每孔 2 ml,放入细胞培养箱内常规培养。待细胞生长基本融合后,换用诱导分化培养液 1(含

0.25 mmol/L IBMX、10 μ g/ml 胰岛素、1 μ mol/L 地塞米松的不完全培养液)进行成脂诱导培养,每 3 d 换液 1 次;换液 2 次后,用诱导分化培养液 2(含 10 μ g/ml 胰岛素、1 μ mol/L 地塞米松的不完全培养液)继续诱导至第 14 天,倒置相差显微镜下观察细胞的分化成脂情况。移除细胞培养基,用 PBS 洗 2 次,参照油红 O 染色液(细胞专用)试剂盒步骤加入油红 O 染色液固定 30 min;蒸馏水洗 2 次,加入 60% 异丙醇浸洗 5 min;弃去异丙醇后加入新配制好的油红 O 染色液浸染 20 min;流水清洗 2~5 次,直到无多余染色液,加入 Mayer 苏木素染色液,复染核 1~2 min;流水清洗 2~5 次,加入油红 O 染色缓冲液室温孵育 1 min 后弃去;加入蒸馏水覆盖细胞并在倒置显微镜下观察,中性脂肪呈橘红色或橙红色,磷脂呈粉红色,细胞核呈蓝色。

1.2.4 OF 成脂后的去分化诱导 使用简单随机分组法,将成脂分化第 14 天细胞随机分为 4 个组,培养液分别换成含 0、0.1、1.0、10.0 μ g/L TNF- α 的完全培养液,于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养;分别于诱导第 0、6、10、18、24、28 天倒置显微镜下固定视野观察细胞质内含脂滴细胞的变化情况,并于脂肪细胞去分化第 20 天再次行油红 O 染色,显微镜下观察染色情况。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 PPAR γ 、ERK1、ERK2 及 perilipin1 mRNA 的表达 取原代 OF 细胞、分化第 14 天及去分化第 20 天细胞,分别提取细胞总 mRNA。使用微量分光光度计测量所提取总 RNA 的浓度,逆转录制备 cDNA;以 cDNA 为模板,行荧光定量 PCR 检测,扩增体系为 10 μ l。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 15 s,共 40 个循环。各目的基因引物设计见表 1,由苏州金唯智生物科技有限公司合成。实验重复操作 3 次,以 GAPDH 为内参照,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 各目的基因 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences for target genes

基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
PPAR γ	GGGATCAGCTCCGTGGATCT	TGCACTTTGGTACTCTTGAAGTT
ERK1	CCAGAGTGGCTATCAAGAAG	TCCATGAGGCTCTGAACAA
ERK2	TGCCGTGGAACAGTTGT	TGGGCTCATCACTTGGGT
PERILIPIN1	GGAGGACGTGGCATGATGAC	GGCCCTTCCATTCTGCAA
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

注:PCR:聚合酶链式反应;PPAR γ :过氧化物酶体增殖生物激活受体 γ ;ERK:细胞外调节蛋白激酶;PERILIPIN:脂肪包被蛋白;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

Note: PCR: polymerase chain reaction; PPAR γ : Peroxisomal proliferation-activated receptor γ ; ERK: extracellular regulatory protein kinase; PERILIPIN: fat-coated protein; GAPDH: phosphoglyceraldehyde dehydrogenase

1.2.6 Western blot 检测 PPAR γ 、P-ERK1/2、perilipin1 蛋白的表达

取原代、分化第 14 天及去分化第 20 天的细胞用预冷 PBS 冲洗 3 次,根据每孔细胞数量加入 50~100 μ l 蛋白裂解液,冰上静置约 10 min 后用细胞刮刀收集细胞于 1.5 ml EP 管中,吹打 20 次,冰上静置 20 min,重复 2 次后 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液于新 EP 管中。测定总蛋白浓度后加入 50 μ l 5 倍蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min,取 20 μ l 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转印至 PVDF 膜;取出膜置于封闭液(其中 PPAR γ 、T-ERK1/2、perilipin1、GAPDH 使用 5%脱脂奶粉封闭,P-ERK1/2 使用 5%牛血清白蛋白封闭)中,室温摇床上轻摇 2 h;将 ERK1/2、P-ERK1/2、PPAR γ 、perilipin1 和 GAPDH 单克隆抗体加入封闭液中,稀释比例均为 1:1 000,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 洗膜 3 次后用山羊抗兔 IgG 室温摇床上轻摇 1 h;再次洗膜 3 次后进行增强化学发光法显色。采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件(美国 IBM SPSS 公司)进行统计分析。各检测指标的定量资料经 W 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组 PPAR γ 、ERK1、ERK2 和 perilipin1 mRNA 以及 PPAR γ 、P-ERK1/2 及 perilipin1 蛋白表达总体比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养人 OF 的形态及鉴定

倒置显微镜下观察,原代培养第 4 天可见少量细胞从眼眶脂肪结缔组织块边缘长出(图 1A);培养第 14 天可见细胞长满培养瓶底部,细胞呈梭形或多角形细胞,增生融合,呈旋涡状排列(图 1B)。免疫荧光结果显示,细胞波形蛋白染色阳性,表明培养细胞属于成纤维细胞(图 1C)。

2.2 OF 的成脂分化及鉴定

光学显微镜下观察可见,诱导分化后 24 h,OF 表

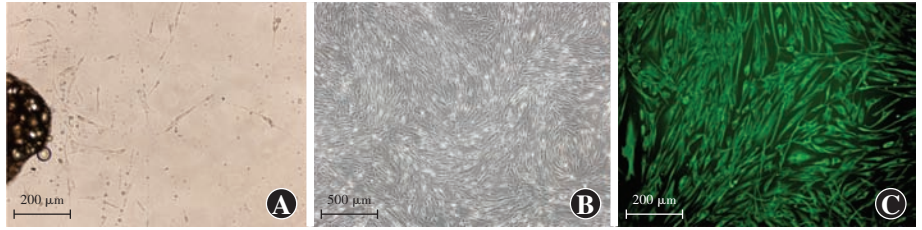


图 1 人 OF 的形态观察及免疫荧光鉴定 A:原代培养至第 4 天,倒置显微镜下可见组织块边缘少量梭形或多角形细胞,贴壁生长($\times 200$,标尺=200 μ m) B:原代培养培养至第 14 天,倒置显微镜下可见细胞融合,呈旋涡状排列($\times 100$,标尺=500 μ m) C:原代培养细胞波形蛋白的免疫荧光染色呈阳性(异硫氰酸荧光素 $\times 200$,标尺=200 μ m)

Figure 1 Morphological observation and immunofluorescence identification of human OF

A:On the 4th day of primary culture, a small number of fusiform or polygonal cells at the edge of the tissue block could be seen under an inverted microscope, and the growth was adherent to the wall ($\times 200$, scale=200 μ m) B:On the 14th day of primary culture, cell fusion and cells in a spiral arrangement were seen under an inverted microscope ($\times 100$, scale = 500 μ m) C:Immunofluorescence staining of vimentin in primary cultured cells was positive (fluorescein isothiocyanate $\times 200$, scale = 200 μ m)

现为细胞回缩,细胞间隙增大,增生逐渐停止,细胞形态渐变为椭圆形或圆形,细胞体积逐渐增大;诱导分化第 6 天,细胞内出现微细脂滴样结构;诱导分化第 10 天,可见较多细胞的细胞质中出现细小、排列紧密的脂滴样结构,光学显微镜下呈透亮的脂肪滴样,小脂滴聚集融合成较大脂滴,可见含有脂滴样结构的细胞数量增加;诱导分化第 14 天,可见部分细胞分化为成熟脂肪细胞,而剩余未分化的细胞形态为圆形或椭圆形,细胞质内未出现明显脂滴(图 2A)。分化第 14 天,细胞油红 O 染色显示,部分细胞的细胞质中出现大小不等红色脂肪滴,部分脂滴分泌出细胞外(图 2B)。

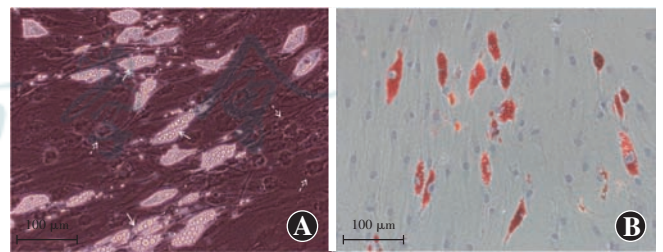


图 2 体外培养 OF 细胞成脂分化及油红 O 染色鉴定($\times 400$,标尺=100 μ m)

A:诱导分化第 14 天,部分细胞的细胞质中含有脂滴样结构(实线箭头),另一部分细胞呈圆形或椭圆形,细胞质中无脂滴样结构(虚线箭头) B:分化第 14 天油红 O 染色显示,部分细胞的胞质中可见大小不等的红色着染脂肪滴,脂肪滴包裹细胞核,并将细胞核推挤到胞质的一侧,部分脂滴分泌出细胞外

Figure 2 Lipid differentiation of OF cultured *in vitro* and identification by oil red O staining ($\times 400$, scale = 100 μ m)

A:On the 14th day of induced differentiation, lipid droplet structures (solid arrows) appeared in the cytoplasm of some cells, while the other round or oval cells had no lipid droplet structures in the cytoplasm (dotted arrows) B:Oil red O staining of cells after 14 days of differentiation showed red-stained fat droplets of various sizes in the cytoplasm of some cells. Fat droplets wrapped around the nucleus and pushed the nucleus to one side of the cytoplasm, and some fat droplets were secreted outside the cell

2.3 OF 成脂后的去分化诱导及鉴定

0 μg/L TNF-α 组去分化诱导后 6、10、20 d 细胞质中脂滴大小未见明显变化。相比于 0 μg/L TNF-α 组, 0.1 μg/L TNF-α 组、1.0 μg/L TNF-α 组、10.0 μg/L TNF-α 组去分化诱导对应时间点细胞质中脂滴减小, 数量减少, 其中 10.0 μg/L TNF-α 组脂肪细胞去分化效果最明显, 去分化 20 d 细胞质内脂滴基本消失, 细胞生长融合 (图 3)。10.0 μg/L TNF-α 组去分化 20 d 细胞质中未见明显油红 O 染料着染 (图 4)。

2.4 各组 PPARγ、ERK1、ERK2 及 perilipin1 mRNA 的表达比较

原代组、分化 14 d 组和去分化 20 d 组细胞中 PPARγ、ERK1、ERK2、perilipin1 mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 574.099、15.378、148.330、370.435$, 均 $P < 0.01$)。分化 14 d 组细胞中 PPARγ、ERK1、ERK2 和 perilipin1 mRNA 相对表达量均高于原代组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 去分化 20 d 组细胞中 PPARγ、ERK2、perilipin1 mRNA

相对表达量均明显低于分化 14 d 组, perilipin1 mRNA 相对表达量明显高于原代组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

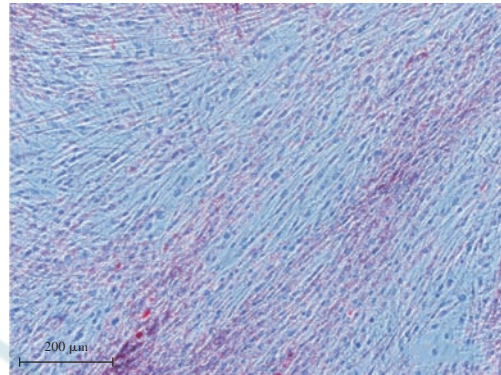


图 4 眼眶成熟脂肪细胞去分化 20 d 油红 O 染色 (×200, 标尺 = 200 μm) 未见明显油红 O 染料着染

Figure 4 Oil red O staining of mature orbital adipocytes after 20-day dedifferentiation (×200, scale = 200 μm) No obvious oil red O staining was seen

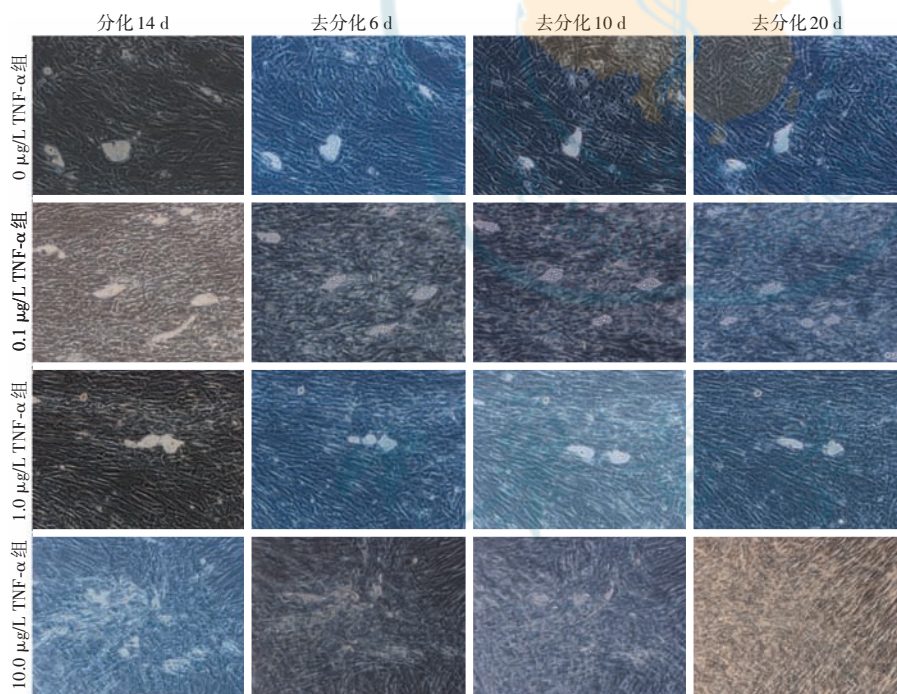


图 3 不同浓度 TNF-α 完全培养基诱导 TAO 眼眶成熟脂肪细胞去分化过程 (×200, 标尺 = 100 μm) 0 μg/L TNF-α 组去分化诱导后细胞质中脂滴大小未见明显变化。0.1 μg/L TNF-α、1.0 μg/L TNF-α、10.0 μg/L TNF-α 组去分化诱导细胞质中脂滴减小, 数量减少, 其中 10.0 μg/L TNF-α 组脂肪细胞去分化效果最明显, 在去分化 20 d 细胞质内脂滴基本消失, 细胞生长融合 TNF: 肿瘤坏死因子

Figure 3 Dedifferentiation of mature adipocytes from TAO orbit induced by complete medium with different concentrations of TNF-α (×200, scale = 100 μm) There was no significant change in the size of lipid droplets in the cytoplasm of 0 μg/L TNF-α group after induced dedifferentiation. Lipid droplets in cytoplasm decreased in size and number in 0.1 μg/L, 1.0 μg/L and 10.0 μg/L TNF-α groups, most obvious in 10.0 μg/L TNF-α group. The lipid droplets in the cytoplasm disappeared and the cells grew and fused after 20 days of dedifferentiation TNF: tumor necrosis factor

2.5 各组 PPARγ、P-ERK1/2、perilipin1 蛋白的表达比较

分化 14 d 组 P-ERK1/2、PPARγ 和 perilipin1 蛋白电泳条带灰度值较原代组明显增强; 去分化 20 d 组 P-ERK1/2、PPARγ 和 perilipin1 蛋白电泳条带灰度值明显减弱, 低于分化 14 d 组 (图 5)。各组 PPARγ、P-ERK1/2、perilipin1 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 368.600、108.500、325.700$, 均 $P < 0.001$), 其中分化 14 d 组各蛋白相对表达量均明显高于原代组和去分化 20 d 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (表 3)。

3 讨论

OF 是 TAO 免疫应答中主要的自身免疫靶细胞和效应细胞, 在 TAO 的发生和发展中具有重要作用^[9-10]。近年来, 关于不同细胞因子及药物对 OF 增生、分泌、分化影响的研究已较为广泛而深入^[11-14]。目前, 人 OF 的体

表 2 原代组、分化 14 d 组、去分化 20 d 组细胞中 PPAR γ 、ERK1、ERK2、perilipin1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of expression levels of PPAR γ , ERK1, ERK2 and perilipin1 mRNA among primary group, 14-day differentiation group and 20-day dedifferentiation group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	PPAR- γ	ERK1	ERK2	perilipin1
原代组	3	1.00 \pm 0.09	1.05 \pm 0.19	1.00 \pm 0.10	1.05 \pm 0.07
分化 14 d 组	3	4.26 \pm 0.09 ^a	2.01 \pm 0.09 ^a	3.23 \pm 0.10 ^a	8.69 \pm 0.33 ^a
去分化 20 d 组	3	1.06 \pm 0.03 ^b	1.73 \pm 0.04	1.15 \pm 0.11 ^b	6.27 \pm 0.09 ^{ab}
F 值		574.099	15.378	148.330	370.435
P 值		<0.001	0.026	0.001	<0.001

注:与原代组比较,^a P <0.05;与分化 14 d 组比较,^b P <0.05(单因素方差分析, LSD- t 检验) PPAR γ : 过氧化物酶体增殖生物激活受体 γ ; ERK: 细胞外调节蛋白激酶; perilipin: 脂肪包被蛋白
 Note: Compared with primary group, ^a P <0.05; compared with 14-day differentiation group, ^b P <0.05 (One-way ANOVA, LSD- t test) PPAR γ : peroxisomal proliferation-activated receptor γ ; ERK: extracellular regulatory protein kinase; perilipin: fat-coated protein

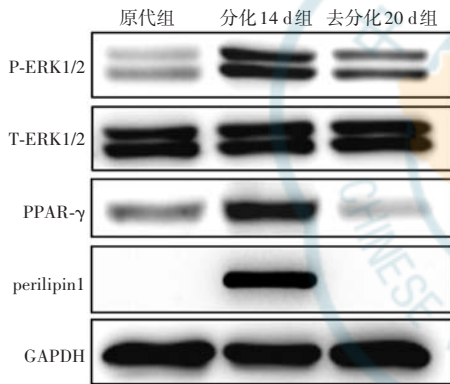


图 5 Western blot 检测各组蛋白表达 分化 14 d 组 perilipin1、PPAR γ 、P-ERK1/2 蛋白条带灰度均明显强于原代组和去分化 20 d 组 P-ERK: 磷酸化细胞外调节蛋白激酶; T-ERK: 总细胞外调节蛋白激酶; PPAR γ : 过氧化物酶体增殖生物激活受体 γ ; perilipin: 脂肪包被蛋白; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

Figure 5 Protein expressions in each group detected by Western blot The bands of perilipin1, PPAR γ and p-ERK1/2 were significantly stronger in 14-day differentiation group than in primary group and 20-day dedifferentiation group P-ERK: phosphorylated extracellular regulatory protein kinase; T-ERK: total extracellular regulatory protein kinase; PPAR γ : peroxisomal proliferation-activated receptor γ ; perilipin: fat-coated protein; GAPDH: phosphoglycerinaldehyde dehydrogenase

外培养方法主要为组织块法和酶消化法, 由于组织块法具有操作简便、需要的组织标本量少等特点, 故本研究中采取组织块法培养人 OF 来进行分化及去分化的研究。

研究结果表明, 依据 Thy-1 抗原 (CD90) 表达的不同, 可将 OF 分为可转化为肌纤维母细胞的 Thy-1⁺ 成纤维细胞和可转化为脂肪细胞的 Thy-1⁻ 成纤维细胞^[15]。在本实验中, 通过使用胰岛素、地塞米松和 IBMX 对原代培养的 OF 进行成脂诱导, 发现诱导至第

14 天时部分细胞分化为脂肪细胞, 而另一部分细胞仅表现为形态上变圆, 细胞质内未出现脂滴样结构, 最终未能被诱导为脂肪细胞。该结果提示 TAO 患者眼眶中同时存在 Thy-1⁺ 和 Thy-1⁻ 的 OF。

去分化是指一个终末分化的细胞退回到其所在细胞谱系中一个低分化状态的过程, 去分化的细胞可以进入细胞周期、分裂增生, 也可以再分化为成熟细胞^[16]。经成熟脂肪细胞去分化后所得到的细胞被称为去分化脂肪细胞, 其具有多向分化潜能, 经过体外诱导后可向脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、内皮细胞、肌细胞、神经细胞等分化^[17-18]; 去分化脂肪细胞还可作为组织工程和干细胞移植的优良干细胞来源, 在治疗缺血性心脏病、骨缺损疾病、肾脏疾病和神经系统疾病等多种临床疾病方面有较好应用前景^[19-21]。在本实验中, 使用 TNF- α 可诱导 OF 分化的脂肪细胞出现去分化现象, 即细胞逐渐由圆形变为长梭形, 细胞内的脂滴逐渐减小, 含有脂滴的细胞也逐渐减少。

TNF- α 作为 T 淋巴细胞、巨噬细胞等分泌的细胞因子之一, 参与 TAO 眼眶炎症、纤维化及脂肪增生等多个病理过程, 并与其他细胞因子相互作用, 共同影响 TAO 的发生和发展^[3]。有研究发现, TNF- α 可下调动脉粥样硬化血管内皮下脂肪细胞表面标志物和相关功能基因, 如 PPAR γ 的表达^[22-23]; 其还可影响脂肪细胞

表 3 原代组、分化 14 d 组及去分化 20 d 组 PPAR γ 、P-ERK1/2、perilipin1 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of expression of PPAR γ , P-ERK1/2 and perilipin1 proteins among primary group, 14-day differentiation group and 20-day dedifferentiation group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	PPAR γ	P-ERK1/2	perilipin1
原代组	3	0.37 \pm 0.02	0.29 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00
分化 14 d 组	3	1.07 \pm 0.03 ^a	1.00 \pm 0.03 ^a	1.13 \pm 0.02 ^a
去分化 20 d 组	3	0.20 \pm 0.02 ^b	0.38 \pm 0.06 ^b	0.00 \pm 0.00
F 值		368.600	108.500	325.700
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与原代组比较,^a P <0.001;与分化 14 d 组比较,^b P <0.001(单因素方差分析, LSD- t 检验) PPAR γ : 过氧化物酶体增殖生物激活受体 γ ; P-ERK: 磷酸化细胞外调节蛋白激酶; perilipin: 脂肪包被蛋白

Note: Compared with primary group, ^a P <0.001; compared with 14-day differentiation group, ^b P <0.001 (One-way ANOVA, LSD- t test) PPAR γ : peroxisomal proliferation-activated receptor γ ; P-ERK: phosphorylated extracellular regulatory protein kinase; perilipin: fat-coated protein

分化,表现为破坏前脂肪细胞的分化,同时诱导成熟脂肪细胞发生去分化,加速脂肪细胞、前脂肪细胞的凋亡^[24-26]。在本实验中,实时荧光定量 PCR 及 Western blot 结果显示,在诱导成脂分化过程中 ERK1/2、PPAR γ 、perilipin1 mRNA 和蛋白表达量均增加,而随着 TNF- α 干预时间的延长,相关脂肪分化通路基因和蛋白表达量逐渐减少,推测 TNF- α 可能通过下调脂肪分化信号通路中 PPAR γ 、ERK1/2 及 perilipin1 基因的表达影响眼眶成熟脂肪细胞的分化,从而对脂肪细胞产生去分化的作用。

综上所述,本研究表明 TNF- α 具有抑制 TAO 眼眶脂肪细胞分化的潜能,可促使 TAO 眼眶脂肪细胞发生去分化现象,其机制可能与下调 ERK1/2-PPAR γ -perilipin1 信号通路有关。本研究为后期进一步探索 TAO 眼眶脂肪异常增生的机制以及优化治疗手段提供了新的思路和实验基础。本实验仅对脂肪细胞分化通路中 PPAR γ 、P-ERK1/2 和 perilipin1 这 3 个基因和蛋白的表达情况进行探索,未来需对该通路其他基因和蛋白的表达情况进行较全面的研究,以进一步明确 TNF- α 致脂肪细胞去分化的通路机制;同时,针对 TNF- α 诱导去分化形成的成纤维样细胞功能及生物学行为变化,以及 TNF- α 是否通过影响其他通路蛋白的表达间接影响脂肪细胞的分化等问题均有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 井雅朋:参与实验设计、研究实施、文章起草及修改;黄晓明、吴桐:参与本实验设计及研究实施;简天明、史双双、赵亮:参与研究实施及统计分析;孙丰源、唐东润:实验设计、对本文的知识性内容作批评性审阅

参考文献

- 王蕾,马建民. 甲状腺相关眼病发病机制的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2017, 53(6): 474-480. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2017. 06. 018.
- Wang L, Ma JM. Progression of the pathogenesis of thyroid associated ophthalmopathy[J]. Chin J Ophthalmol, 2017, 53(6): 474-480. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2017. 06. 018.
- Kim DW, Taneja K, Hoang T, et al. Transcriptomic profiling of control and thyroid-associated orbitopathy (TAO) orbital fat and TAO orbital fibroblasts undergoing adipogenesis[J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(9): 24[2022-12-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34269815>. DOI: 10. 1167/iovs. 62. 9. 24.
- Łacheta D, Miśkiewicz P, Głuszko A, et al. Immunological aspects of Graves' ophthalmopathy[J/OL]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 7453260[2022-12-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31781640>. DOI: 10. 1155/2019/7453260.
- Makoveichuk E, Vorršnjö E, Olivecrona T, et al. TNF- α decreases lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes by up-regulation of angiopoietin-like protein 4[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(5): 533-540. DOI: 10. 1016/j. bbalip. 2017. 02. 005.
- Jung TW, Kim ST, Lee JH, et al. Phosphatidylcholine causes lipolysis and apoptosis in adipocytes through the tumor necrosis factor alpha-dependent pathway[J]. Pharmacology, 2018, 101(3-4): 111-119. DOI: 10. 1159/000481571.
- Rui Y, Tong L, Cheng J, et al. Rosmarinic acid suppresses adipogenesis, lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- α secretion in macrophages, and inflammatory mediators in 3T3-L1 adipocytes[J/OL]. Food Nutr Res, 2017, 61(1): 1330096[2022-12-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28659738>. DOI: 10. 1080/16546628. 2017. 1330096.
- Tan X, Cao Z, Li M, et al. TNF- α downregulates CIDEA via MEK/ERK pathway in human adipocytes[J]. Obesity (Silver Spring), 2016, 24(5): 1070-1080. DOI: 10. 1002/oby. 21436.
- 易文殊, 许雪亮. 美伐他汀对甲状腺相关眼眶前脂肪细胞分化及炎症反应的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(10): 907-912. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 10. 010.
- Yi WS, Xu XL. Inhibition of mevastatin on inflammation and differentiation of orbital preadipocytes in thyroid-associated ophthalmopathy[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(10): 907-912. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 10. 010.
- Shan SJ, Douglas RS. The pathophysiology of thyroid eye disease[J]. J Neuroophthalmol, 2014, 34(2): 177-185. DOI: 10. 1097/WNO. 000000000000132.
- Smith TJ, Janssen J. Insulin-like growth factor-I receptor and thyroid-associated ophthalmopathy[J]. Endocr Rev, 2019, 40(1): 236-267. DOI: 10. 1210/er. 2018-00066.
- Li B, Guo J, Wang F, et al. Effect of Prunella vulgaris polysaccharides on cultured orbit fibroblasts *in vitro* from patients with thyroid-associated ophthalmopathy[J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 201: 108276[2022-12-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32991886>. DOI: 10. 1016/j. exer. 2020. 108276.
- 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.
- 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.
- 陈小玲, 何为民. 透明质酸与甲状腺相关眼病研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(11): 1047-1050. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 11. 018.
- Chen XL, He WM. Current research of hyaluronic acid and thyroid-associated ophthalmopathy[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(11): 1047-1050. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 11. 018.
- Koumas L, Smith TJ, Feldon S, et al. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes[J]. Am J Pathol, 2003, 163(4): 1291-1300. DOI: 10. 1016/S0002-9440(10)63488-8.
- Wei S, Bergen WG, Hausman GJ, et al. Cell culture purity issues and DFAT cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(3): 273-275. DOI: 10. 1016/j. bbr. 2013. 03. 006.
- Song T, Kuang S. Adipocyte dedifferentiation in health and diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(20): 2107-2119. DOI: 10. 1042/CS20190128.
- Côté JA, Ostinelli G, Gauthier MF, et al. Focus on dedifferentiated adipocytes: characteristics, mechanisms, and possible applications[J]. Cell Tissue Res, 2019, 378(3): 385-398. DOI: 10. 1007/s00441-019-03061-3.
- Song T, Kuang S. Adipocyte dedifferentiation in health and diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(20): 2107-2119. DOI: 10. 1042/CS20190128.
- Asami T, Soejima K, Kashimura T, et al. Effects of combination therapy using basic fibroblast growth factor and mature adipocyte-derived

- dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin graft revascularisation [J]. J Plast Surg Hand Surg, 2015, 49 (4) : 229 - 233. DOI: 10. 3109/2000656X. 2015. 1020315.
- [21] Ishioka S, Hosokawa T, Ikeda T, et al. Therapeutic potential of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for inflammatory bowel disease [J]. Pediatr Surg Int, 2020, 36 (7) : 799 - 807. DOI: 10. 1007/s00383-020-04681-5.
- [22] Sharma VM, Puri V. Mechanism of TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes uncovered [J/OL]. Obesity (Silver Spring), 2016, 24 (5) : 990 [2022 - 12 - 18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27061059>. DOI: 10. 1002/oby. 21492.
- [23] Ye J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374 (3) : 405 - 408. DOI: 10. 1016/j.bbrc. 2008. 07. 068.
- [24] Engin AB. Adipocyte-macrophage cross-talk in obesity [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 960 : 327 - 343. DOI: 10. 1007/978-3-319-48382-5_14.
- [25] Jung TW, Park T, Park J, et al. Phosphatidylcholine causes adipocyte-specific lipolysis and apoptosis in adipose and muscle tissues [J/OL]. PLoS One, 2019, 14 (4) : e0214760 [2022 - 12 - 18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30958839>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0214760.
- [26] Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF- α and obesity [J]. Curr Dir Autoimmun, 2010, 11 : 145 - 156. DOI: 10. 1159/000289203.

(收稿日期:2023-03-17 修回日期:2023-09-25)

(本文编辑:张宇 骆世平)

消息

《外伤性白内障显微联合手术学》出版发行

日前,由郑州大学第一附属医院眼科郑广瑛教授主编,张效房、张金嵩教授审校的《外伤性白内障显微联合手术学》,已由人民卫生出版社于今年 8 月份正式出版发行。该书是郑广瑛教授潜心耕耘专业领域三十余载,基于多年临床积累打造的用心之作,并携手郑州大学第一附属医院眼科白内障、眼外伤、青光眼和眼底病等相关专业研究团队,同时邀请浙江大学医学院附属第二医院和北京同仁医院的相关专业的知名专家教授共同编撰完成,填补了我国白内障领域眼外伤诊疗书籍的空白。

外伤性白内障是临床上常见的眼外伤并发症,居单眼盲致盲病因的首位。与其他类型白内障不同的是,外伤性白内障病情复杂,往往伴有眼外伤的其他并发症和后遗症,单纯做白内障手术不仅不能恢复良好而稳定的视力,反而会因手术创伤而加重眼外伤的继发损伤。因而对外伤性白内障的处理不仅要严格选择手术适应证和手术时机,还要根据其不同并发症和后遗症选择不同的联合手术,术后方能获得良好而稳定的视功能。

该书分 3 篇 26 章,100 余万字,插图 700 余幅,视频 31 个,系统地介绍了外伤性白内障的基础理论、分类及临床特点、病理生理学及免疫学特征、术前检查、手术适应证、手术时机的选择,各种联合手术的基本技术和操作要点、不同类型外伤性白内障的手术方法、人工晶状体的选择,以及并发症的防治。其既有对传统经典眼外伤诊疗技术的传承,又贯穿了近年来该领域的新知识、新技术和新理念,是开展疑难复杂性白内障,尤其是外伤性白内障显微联合手术的眼科医师必备的参考书和工具书,也为广大年轻医生系统理解、掌握外伤性白内障的基础理论知识和临床操作技能提供了切实的指导和参考教程。

该书分 3 篇 26 章,100 余万字,插图 700 余幅,视频 31 个,16 开,精装,彩色印刷,售价:246.00 元。人民卫生出版社天猫旗舰店、京东、当当网、全国新华书店、专业书店、人卫智慧服务商城等均有销售。如需购买,也可扫描二维码超值购买。



(本刊编辑部)

广告目次

瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二

沉痛悼念陈祖基教授……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……后插页

中华医学会杂志社英文系列期刊 《中华医学杂志》社有限责任公司……后插页

中华医学期刊全文数据库 《中华医学杂志》社有限责任公司……封三

迈达科技 天津迈达医学科技股份有限公司……封底