DOI：10.16781/j.0258-879x.2020.04.0424

·论　著·

穿透素 3 对转化生长因子 β1 诱导的眼眶成纤维细胞纤维化的影响

刁嘉乐，魏锐利*
海军军医大学（第二军医大学）长征医院眼科，上海 200003

［摘要］ **目的** 探索穿透素 3（PTX3）对 TGF-β 诱导的眼眶成纤维细胞（OF）纤维化的作用。**方法** 以体外培养的甲状腺相关眼病 （TAO）患者来源及健康来源 OF 为研究对象，在培养液中加入人重组 PTX3（rhPTX3）蛋白（1 μg/mL）及重组 TGF-β1（10 ng/mL）进行刺激，刺激完成后选择特异性抗体标记细胞中 α- 平滑肌肌动蛋白（α-SMA），通过免疫荧光显微镜观察 OF 的纤维化程度变化。给予细胞相同的刺激，刺激后通过 qRT-PCR 检测细胞中 *α-SMA*、Ⅰ型胶原蛋白 α1（*Col*Ⅰ*α1*）、*IL*-6 mRNA 表达量的变化。**结果** TGF-β1 可诱导两组 OF 中 α-SMA 蛋白表达量增加，细胞呈现纤维化改变，而 rhPTX3 对该效应未见明显抑制作用。TAO 患者来源 OF 的纤维化效应较健康来源 OF 无明显差异。TGF-β1 可诱导 OF 纤维化相关蛋白（*α-SMA*、*Col*Ⅰ*α1*、*IL*-6）mRNA 表达上调。rhPTX3 对 OF 中 *α-SMA* mRNA 的表达无明显诱导作用，但共刺激时可增强 TGF-β1 对 *α-SMA* mRNA 的上调效应。rhPTX3 可上调 *Col*Ⅰ*α1* 和 *IL*-6 mRNA 的表达，共刺激时可增强 TGF-β1 对 *IL*-6 mRNA 的诱导上调，但对 *Col*Ⅰ*α1* mRNA 的上调未见明显影响。**结论** rhPTX3 对 TGF-β1 诱导的 OF 纤维化过程具有潜在的促进作用，说明 PTX3 可能参与了 TAO 患者后期视物重影的发病过程，并发挥了正向作用。

［关键词］ 穿透素 3；甲状腺相关眼病；眼眶成纤维细胞；转化生长因子 β；纤维化
［中图分类号］ R 771.3　［文献标志码］ A　［文章编号］ 0258-879X(2020)04-0424-05

Effect of pentraxin 3 on transforming growth factor β1-induced fibrosis in orbital fibroblasts

DIAO Jia-le, WEI Rui-li*
Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of pentraxin 3 (PTX3) in transforming growth factor β1 (TGF-β1)-induced fibrosis in orbital fibroblasts (OFs). **Methods** OFs from thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) patients and healthy donors were cultured *in vitro*. The human recombinant PTX3 (rhPTX3) (1 μg/mL) and human recombinant TGF-β1 (10 ng/mL) were added to the culture medium for stimulation. After stimulation, specific antibody was selected to label the anti-α-smooth muscle actin (α-SMA), and the fibrosis of OFs was observed by fluorescence microscope. The mRNA expression levels of *α-SMA*, collagen type Ⅰ α1 (*Col*Ⅰ*α1*) and interleukin 6 (*IL-6*) were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction after the same stimulation. **Results** TGF-β1 induced the expression of α-SMA protein in the two groups of OFs, and the cells showed fibrotic changes, while the rhPTX3 had no significant inhibition. There was no significant difference in the fibrotic effect of OFs between the patients with TAO and healthy donors. The mRNA expression levels of fibrotic protein (*α-SMA*, *Col*Ⅰ*α1*, and *IL-6*) were upregulated by TGF-β1 in OFs. The rhPTX3 had no significant induction for the expression of *α-SMA* mRNA in OFs, but co-stimulation could significantly enhance the upregulation of *α-SMA*. The rhPTX could upregulate the mRNA expression of *Col*Ⅰ*α1* and *IL-6*. Co-stimulation could enhance the induction of upregulation of *IL-6* by TGF-β1, but had no significant effect on the upregulation of *Col*Ⅰ*α1*. **Conclusion** The rhPTX3 has a potential role in promoting TGF-β1-induced fibrosis in OFs, which indicates that PTX3 may be involved in the later stage of the pathogenesis of diplopia in TAO patients and play a positive role.

［收稿日期］ 2020-03-09　［接受日期］ 2020-04-07
［基金项目］ 国家自然科学基金（81770959），国家科技重大专项（2017ZX09304010）. Supported by National Natural Science Foundation of China (81770959) and National Science and Technology Major Project of China (2017ZX09304010).
［作者简介］ 刁嘉乐，硕士生，住院医师. E-mail: 357929658@qq.com
* 通信作者（Corresponding author）. Tel: 021-81885921, E-mail: ruiliwei@126.com

[Key words] pentraxin 3; thyroid associated ophthalmopathy; orbital fibroblasts; transforming growth factor β; fibrosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(4): 424-428]

甲状腺相关眼病（thyroid-associated ophthalmopathy，TAO）是成人最常见的眼眶病之一，与甲状腺自身免疫异常密切相关[1]。眼外肌功能障碍导致的视物重影是TAO较为常见的临床表现之一，对患者生活质量影响较大，通常发生于疾病后期及眼眶减压术后[2]。TAO的发病机制尚不明确，就目前研究结果来看，眼眶成纤维细胞（orbital fibroblast，OF）是患者眼眶内病理改变的基础，TGF-β诱导的OF纤维化也是患者视物重影的主要原因[3]。

在以往的研究中，我们发现穿透素3（pentraxin 3，PTX3）作为一种体液免疫中的模式识别分子，在TAO患者眼眶脂肪结缔组织及血液中高表达[4]，同时促甲状腺激素（thyroid stimulating hormone，TSH）可以诱导OF表达PTX3[5]，因此我们认为PTX3与TAO的发病高度相关。研究发现PTX3参与人体皮肤创伤修复、特发性肺纤维化及肾间质纤维化等多个病理生理过程[6-7]，但PTX3在TAO后期纤维化中的作用尚未见报道。本研究拟应用人重组PTX3（human recombinant PTX3，rhPTX3）蛋白和重组TGF-β1刺激体外培养的OF，探索PTX3对TGF-β1诱导的OF纤维化过程的影响。

1 材料和方法

1.1 样本收集 本研究所纳入的TAO患者来源OF取自2018年7月至2019年2月在我科行眼眶减压术的TAO患者，共3例3眼，女2例、男1例，年龄27～45岁，均按照欧洲Graves眼病专家组（European Group on Graves' Orbitopathy，EUGOGO）标准[8]确诊TAO，患者术前甲状腺功能稳定6个月以上，眼部情况稳定6个月以上，无放射治疗史，未行大剂量糖皮质激素冲击治疗或停用6个月以上。健康来源OF取自2018年8月至2019年1月在我科行上睑下垂矫正术及眼袋整形术的患者，共3例3眼，女2例、男1例，年龄29～34岁，排除自身免疫性疾病及其他眼病，根据患者病情于术中取得脱出眶隔的脂肪结缔组织标本。本研究经海军军医大学（第二军医大学）生物医学伦理委员会审批，患者及家属签署知情同意书后获取相关标本。

1.2 试剂和仪器 DMEM高糖培养液、FBS及0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液购自美国Gibco公司，青霉素-链霉素溶液（100×）购自上海碧云天生物技术有限公司，TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司，无水乙醇及甲醇购自上海国药集团，TB Green® Premix *Ex Taq*™ 和PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒购自日本TaKaRa公司，人重组TGF-β1购自美国Peprotech公司，rhPTX3蛋白和重组α平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）抗体购自英国Abcam公司。

低温超速离心机（德国Hettich公司），超净工作台和CO_2恒温培养箱（美国Thermo公司），倒置相差显微镜（日本Nikon公司），ABI 7900HT荧光定量PCR仪和普通PCR仪（美国ABI公司），荧光分光光度计（美国NanoDrop公司）。

1.3 OF培养 手术中取下眼眶脂肪结缔组织标本后，于无菌条件下迅速转移至盛有含20% FBS和1%青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养液的离心管中。将离心管置入冰水混合物中，快速转运（1 h内）至细胞房超净台（超净台经紫外线消毒30 min）。采用经典组织块培养法培养细胞并传代，第4～10代OF用于后续实验。

1.4 实验分组 用含1% FBS的培养液饥饿处理细胞12 h后，分别将TAO患者来源OF和健康来源OF分为4组：空白组加入完全培养液处理细胞；rhPTX3组加入含1 μg/mL rhPTX3的完全培养液处理细胞；TGF-β1组加入含10 ng/mL TGF-β1的完全培养液处理细胞；rhPTX3＋TGF-β1组加入含1 μg/mL rhPTX3和10 ng/mL TGF-β1的完全培养液处理细胞。

1.5 细胞免疫荧光实验 按照实验分组将OF以每孔3×10^4个细胞的密度接种到96孔细胞培养板中，并置于5% CO_2、37 ℃细胞培养箱孵育至细胞贴壁融合生长。细胞处理完成后，吸弃原有培养液后加入100 μL甲醇，置于－20 ℃进行细胞固定。用0.1% Triton X-100（PBS配制）溶液完成细胞透化后，封闭非特异性抗原位点。室温下依次孵育特异性一抗及二抗，DAPI染核后于荧光显微镜下观察。

1.6 qRT-PCR 采用TRIzol法提取细胞总RNA，经PrimeScript™ RT Master Mix反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA后，应用TB Green® Premix *Ex*

Taq[TM] 试剂盒配制反应体系，384 孔板加样离心混匀后进行 PCR 反应，用 SDS 2.4 软件分析目的基因相对表达量。具体实验方法见各试剂盒说明书。该部分实验所使用的引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司代为合成，具体序列如下：*α-SMA* 上游引物 5′-GGT GAT GGT GGG AAT GGG-3′，下游引物 5′-GCA GGG TGG GAT GCT CTT-3′；*GAPDH* 上游引物 5′-TTG CCA TCA ATG ACC CCT A-3′，下游引物 5′-CGC CCC ACT TGA TTT TGG-3′；Ⅰ型胶原蛋白 α1（collagen type Ⅰ α1，*ColⅠα1*）上游引物 5′-GAG GGC CAA GAC GAA GAC ATC-3′，下游引物 5′-CAG ATC ACG TCA TCG CAC AAC-3′；*IL*-6 上游引物 5′-ACT CAC CTC TTC AGA ACG AAT TG-3′，下游引物 5′-CCA TCT TTG GAA GGT TCA GGT TG-3′。

1.7　统计学处理　采用 GraphPad Prism 7.04 软件绘图，SPSS 21.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。检验标准（α）为 0.05。

2　结　果

2.1　rhPTX3 蛋白对 TGF-β1 诱导的 OF 分化的影响　细胞免疫荧光实验结束（图 1）显示，OF 培养 5 d 后，空白组中 OF 均为纺锤形、低荧光的正常成纤维细胞形态；rhPTX3 组 OF 细胞形态及 α-SMA 蛋白表达未发生明显变化；TGF-β1 组 OF 形态明显改变，α-SMA 蛋白强阳性、表达增加，说明其已分化为肌成纤维细胞并发生纤维化；rhPTX3＋TGF-β1 组与 TGF-β1 组相比没有明显改变，且 TAO 患者来源 OF 和健康来源 OF 对 TGF-β1 和 rhPTX3 的反应无明显差异。

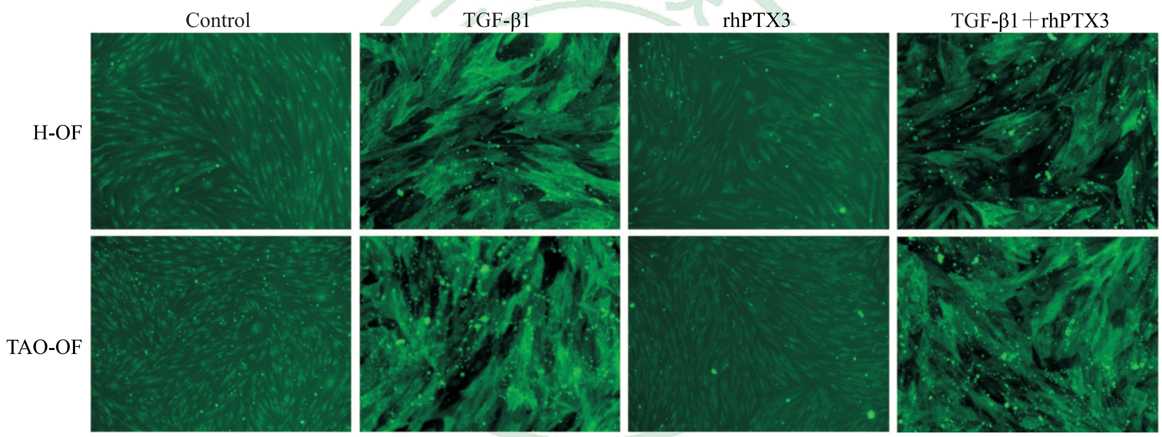

图 1　rhPTX3 对 TGF-β1 诱导的 OF 向肌成纤维细胞分化的影响

Fig 1　Effect of rhPTX3 on TGF-β1-induced fibrosis in OFs

Green fluorescence showing positive expression of α-smooth muscle actin. rhPTX3: Human recombinant pentraxin 3; TGF-β1: Transforming growth factor β1; OF: Orbital fibroblast; H-OF: OF cultured from healthy donors; TAO-OF: OF cultured from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. Original magnification: ×100

2.2　rhPTX3 蛋白对 TGF-β1 诱导的 *ColⅠα1* 和 *α-SMA* mRNA 表达的影响　结果如图 2A 所示，TGF-β1 上调 OF 内 *α-SMA* mRNA 的表达量（相当于对照组的 7.97±0.69 倍，*P*＜0.01），rhPTX3 本身对 *α-SMA* mRNA 的表达无明显影响，但与 TGF-β1 共处理 OF 可增强 TGF-β1 对 *α-SMA* 的诱导作用，*α-SMA* mRNA 的表达量上升（相当于对照组的 18.43±1.23 倍，*P*＜0.01）；rhPTX3 对 *ColⅠα1* mRNA 的表达并没有表现出类似的效应（图 2B），rhPTX3、TGF-β1 及两者共同刺激均可上调 *ColⅠα1* mRNA 表达（分别相当于对照组的 3.27±0.35、2.69±0.32、3.24±0.18 倍，与对照组比较 *P*＜0.01），但 3 组间差异无统计学意义。

2.3　rhPTX3 蛋白对 TGF-β1 诱导的 *IL*-6 mRNA 表达的影响　TGF-β1 和 rhPTX3 均上调 OF 内 IL-6 mRNA 的表达量，分别相当于对照组的 93.33±19.22 倍和 121.25±18.81 倍（*P* 均＜0.01）。rhPTX3 与 TGF-β1 共处理 OF 组 *IL*-6 mRNA 表达的上调幅度远远超过两者单独作用的诱导效应之和，相当于对照组的 549.32±59.69 倍（*P*＜0.01）。见图 3。

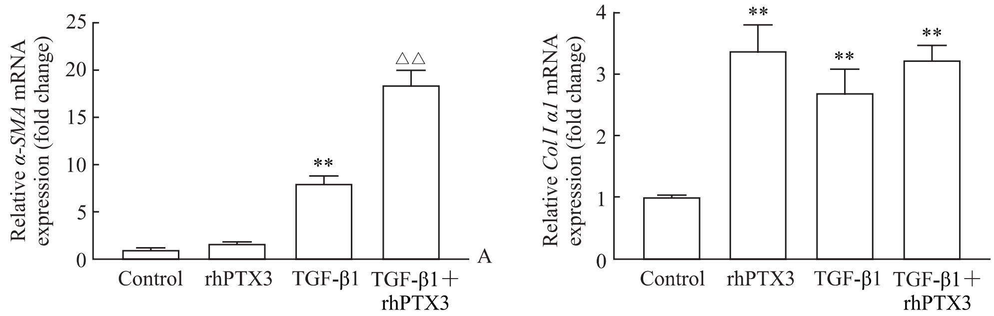

图 2　rhPTX3 对 OF 内 *α-SMA* 和 *Col1α1* mRNA 表达的影响

Fig 2　Effect of rhPTX3 on *α-SMA* and *Col1α1* mRNA expression in OFs

rhPTX3: Human recombinant pentraxin 3; OF: Orbital fibroblast (cultured from healthy donors); α-SMA: α-smooth muscle actin; Col Ⅰ α1: Collagen type Ⅰ α1; TGF-β1: Transforming growth factor β1. $^{**}P<0.01$ vs control group; $^{\triangle\triangle}P<0.01$ vs TGF-β1 group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

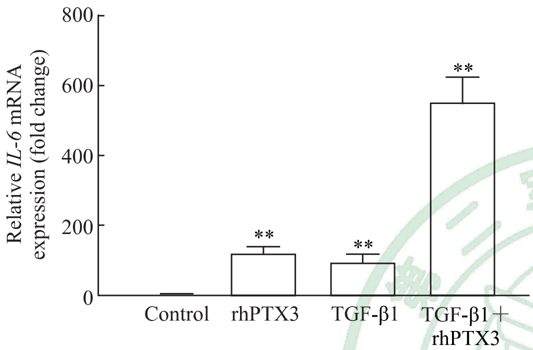

图 3　rhPTX3 对 OF 内 *IL*-6 mRNA 表达的影响

Fig 3　Effect of rhPTX3 on *IL*-6 mRNA expression in OFs

rhPTX3: Human recombinant pentraxin 3; OF: Orbital fibroblast (cultured from healthy donors); IL-6: Interleukin 6; TGF-β1: Transforming growth factor β1. $^{**}P<0.01$ vs control group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3　讨　论

自 20 世纪 90 年代研究者发现 TGF-β 可以诱导 OF 产生黏多糖并发生纤维化改变[9]以来，对 TAO 发病过程中纤维化的探索均围绕这一病理过程展开。近年有研究发现 TGF-β1 可以诱导 TAO 患者来源 OF 中鞘氨醇磷酸酯和 miRNA-146a 的水平升高，前者可能介导了 OF 内纤维化相关指标的升高[10]，而后者在 TGF-β 诱导的纤维化过程中发挥了负性调节的作用[11]。此外，Fang 等[12]研究发现，IL-17A 可以促进 TGF-β 诱导的 $CD90^+$ OF 纤维化，同时抑制 $CD90^-$ OF 的脂肪化。

我们的前期研究已经证实 PTX3 与 TAO 发病高度相关[4-5]，而 PTX3 与组织重构纤维化之间的紧密联系也被越来越多的研究所证实，如 Hung 等[13]发现 PTX3 可以通过激活 JNK 信号通路调节上皮间质转化诱导细胞迁移，参与肾小管间质纤维化；Pilling 等[14]发现 PTX3 广泛分布于特发性肺纤维化患者的肺组织中，同时促进人外周血中单核细胞来源的纤维细胞分化。有趣的是，目前在 TAO 的研究中发展出一个新的观点，该观点认为外周血中 $CD34^+$ 纤维细胞有可能通过血液循环到达眼眶，并分化成眼眶中 $CD34^+$ OF，参与 TAO 的发病[15]。上述发现说明 PTX3 很可能参与了 TAO 纤维化的病理过程。考虑到 TAO 患者来源的眼眶脂肪结缔组织中 PTX3 表达较高[4]，我们选择在培养液中加入 rhPTX3，模拟 OF 在 TAO 患者眼眶中的高水平 PTX3 环境，观察 TGF-β1 的纤维化效应是否发生改变。细胞免疫荧光实验结果表明，rhPTX3 对 TGF-β1 诱导的纤维化没有明显的抑制效应。qRT-PCR 结果中 *α-SMA* mRNA 表达量发生改变，进一步证明 rhPTX3 不影响 α-SMA 表达，却可以与 TGF-β1 协同上调 α-SMA 的表达，符合 PTX3 促进纤维化的假设。令人费解的是，*Col1α1* 并未表现出与 α-SMA 同样的特征，rhPTX3、TGF-β1 或是两者共同刺激均可上调其表达，但 3 组的调节幅度间差异无统计学意义。由于论证手段的局限性，以上结果仅能在一定程度上提示 PTX3 可能会促进 TGF-β1 诱导 OF 纤维化，还需要更多针对 OF 的功能学实验证明 PTX3 含量改变对 OF 表型的影响。

此外，IL-6 作为一个传统的内生性致热原和炎性因子，近期在纤维化疾病的领域中得到了关注。Papiris 等[16]研究了特发性肺纤维化患者血液样本，发现存在 IL-6 增高的特征。无独有偶，在 2020 年的一项研究中发现，特发性肺纤维化患者来源的人肺成纤维细胞中 IL-6 受体表达较高，IL-6 可以激活细胞内 TGF-β 信号通路相关蛋白[17]。然而，在

TAO 发病机制的研究中，IL-6 的升高仅仅被认为是 TSH 受体激活、CD40-CD154 诱导、前炎性因子刺激的结果，并参与 TAO 眼眶炎症环境的延续和 B 淋巴细胞的成熟[18]，其在纤维化中的作用及其与 TGF-β 之间的关系尚未见研究报道。本研究首次发现 TGF-β1 可以上调 OF 中 IL-6 表达，且 PTX3 蛋白对该诱导效应有协同作用，能大幅度上调 IL-6 的表达。PTX3 最初是作为一种急性期炎症蛋白被发现的，IL-6 可以诱导其他 2 种穿透素的生成，却对 PTX3 的表达没有明显作用[19]。本研究发现 OF 中 PTX3 对 IL-6 表达具有上调作用，即 PTX3、TGF-β 和 IL-6 三者的相互作用可能是 TAO 眼眶中炎症和纤维化进程交联的关键环节，该作用为 TAO 发病机制的研究提供了新的思路，也为临床提供了潜在的治疗靶点。

[参 考 文 献]

[1] BAHN R S, GARRITY J A, GORMAN C A. Clinical review 13: diagnosis and management of graves' ophthalmopathy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1990, 71: 559-563.

[2] HARRAD R. Management of strabismus in thyroid eye disease[J]. Eye (Lond), 2015, 29: 234-237.

[3] VAN STEENSEL L, DIK W A. The orbital fibroblast: a key player and target for therapy in Graves' ophthalmopathy[J]. Orbit, 2010, 29: 202-206.

[4] MOU P, CHEN Z, JIANG L, CHENG J, WEI R. PTX3: a potential biomarker in thyroid associated ophthalmopathy[J/OL]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 5961974. doi:10.1155/2018/5961974.

[5] WANG H, ATKINS S J, FERNANDO R, WEI R L, SMITH T J. Pentraxin-3 is a TSH-inducible protein in human fibrocytes and orbital fibroblasts[J]. Endocrinology, 2015, 156: 4336-4344.

[6] DONI A, MUSSO T, MORONE D, BASTONE A, ZAMBELLI V, SIRONI M, et al. An acidic microenvironment sets the humoral pattern recognition molecule PTX3 in a tissue repair mode[J]. J Exp Med, 2015, 212: 905-925.

[7] XIAO Y, YANG N, ZHANG Q, WANG Y, YANG S, LIU Z. Pentraxin 3 inhibits acute renal injury-induced interstitial fibrosis through suppression of IL-6/Stat3 pathway[J]. Inflammation, 2014, 37: 1895-1901.

[8] BARTALENA L, BALDESCHI L, BOBORIDIS K, ECKSTEIN A, KAHALY G J, MARCOCCI C, et al. The 2016 European Thyroid Association/European Group on Graves' Orbitopathy guidelines for the management of Graves' orbitopathy[J]. Eur Thyroid J, 2016, 5: 9-26.

[9] KORDUCKI J M, LOFTUS S J, BAHN R S. Stimulation of glycosaminoglycan production in cultured human retroocular fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33: 2037-2042.

[10] KO J, CHAE M K, LEE J H, LEE E J, YOON J S. Sphingosine-1-phosphate mediates fibrosis in orbital fibroblasts in Graves' orbitopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58: 2544-2553.

[11] JANG S Y, PARK S J, CHAE M K, LEE J H, LEE E J, YOON J S. Role of microRNA-146a in regulation of fibrosis in orbital fibroblasts from patients with Graves' orbitopathy[J]. Br J Ophthalmol, 2018, 102: 407-414.

[12] FANG S, HUANG Y, ZHONG S, LI Y, ZHANG Y, LI Y, et al. Regulation of orbital fibrosis and adipogenesis by pathogenic Th17 cells in Graves orbitopathy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017, 102: 4273-4283.

[13] HUNG T W, TSAI J P, LIN S H, LEE C H, HSIEH Y H, CHANG H R. Pentraxin 3 activates JNK signaling and regulates the epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40: 1029-1038.

[14] PILLING D, COX N, VAKIL V, VERBEEK J S, GOMER R H. The long pentraxin PTX3 promotes fibrocyte differentiation[J/OL]. PLoS One, 2015, 10: e0119709. doi:10.1371/journal.pone.0119709.

[15] SMITH T J. Potential roles of $CD34^{+}$ fibrocytes masquerading as orbital fibroblasts in thyroid-associated ophthalmopathy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104: 581-594.

[16] PAPIRIS S A, TOMOS I P, KARAKATSANI A, SPATHIS A, KORBILA I, ANALITIS A, et al. High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations[J]. Cytokine, 2018, 102: 168-172.

[17] EPSTEIN SHOCHET G, BROOK E, BARDENSTEIN-WALD B, SHITRIT D. TGF-β pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) fibroblast derived soluble factors is mediated by IL-6 trans-signaling[J/OL]. Respir Res, 2020, 21: 56. doi:10.1186/s12931-020-1319-0.

[18] HWANG C J, AFIFIYAN N, SAND D, NAIK V, SAID J, POLLOCK S J, et al. Orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy overexpress CD40: CD154 hyperinduces IL-6, IL-8, and MCP-1[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50: 2262-2268.

[19] ALLES V V, BOTTAZZI B, PERI G, GOLAY J, INTRONA M, MANTOVANI A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes[J]. Blood, 1994, 84: 3483-3493.

[本文编辑]　尹　茶