

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01138

• 短篇论著 •

可溶性 CD40L 促进甲状腺相关性眼病患者眼眶成纤维细胞增殖和透明质酸合成酶表达

曾程程, 魏锐利*, 牟 旆, 王秋红

第二军医大学长征医院眼科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨可溶性 CD40L(sCD40L)对甲状腺相关性眼病(TAO)患者眼眶成纤维细胞(OFs)增殖和3种透明质酸合成酶(HAS) mRNA 表达水平的影响,初步探讨 sCD40L 在 TAO 发病中的作用。**方法** 取5例 TAO 患者和3例正常对照标本原代培养 OFs,采用 MTS 比色法检测终质量浓度 6.25、12.5、25、50、100、200 ng/mL 的 sCD40L 作用 48 h 后对不同来源 OFs 增殖的影响;实时荧光定量 PCR 技术检测终质量浓度 12.5、25、50、100 ng/mL 及作用 3、6、12、24 h 后的 sCD40L 对不同来源 OFs 的 3 种 HAS 基因(HAS1~3)表达水平的影响。**结果** 25 ng/mL 及以上浓度的 sCD40L 作用 48 h 后对 TAO 患者 OFs 有促增殖作用($P<0.05$);而 50 ng/mL 及以上浓度的 sCD40L 作用 48 h 后才能对正常对照 OFs 有促增殖作用($P<0.05$),且作用较弱。TAO 患者 OFs 中 HAS3 mRNA 的合成在 sCD40L 的刺激下增加,并且呈现出浓度和时间依赖的趋势。**结论** sCD40L 能够促进 TAO 患者 OFs 的生长以及 HAS3 基因的表达,提示 sCD40L 在 TAO 的病理过程中起一定作用。

[关键词] 可溶性 CD40 配体;Graves 眼病;眼眶成纤维细胞;透明质酸合成酶

[中图分类号] R 581.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)10-1138-05

Soluble CD40L promotes proliferation of orbital fibroblasts and expression of hyaluronan synthase in patients with thyroid associated ophthalmopathy

ZENG Cheng-cheng, WEI Rui-li*, MOU Pei, WANG Qiu-hong

Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of soluble CD40L (sCD40L) on proliferation of orbital fibroblasts (OFs) and the expression of three types of hyaluronan synthase (HAS) *in vitro*, so as to explore the role of sCD40L in the pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy (TAO). **Methods** OFs obtained from 5 patients with TAO and 3 normal controls were primarily cultured. The effect of different concentrations of sCD40L (6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 ng/mL) on proliferation of OFs of different sources were examined by MTS after 48 h exposure. OFs were also cultured with different concentrations of sCD40L (12.5, 25, 50 and 100 ng/mL) for 3, 6, 12 and 24 h, and then the expression levels of HAS 1-3 mRNA were determined by real-time RT-PCR. **Results** Treatment with sCD40L at concentrations higher than 25 ng/mL for 48 h obviously promoted the proliferation of OFs in patients with TAO ($P<0.05$). In contrast, treatment with sCD40L only at concentrations higher than 50 ng/mL for 48 h could promote proliferation of OFs from normal control, and the effect was comparatively weak. HAS3 mRNA expression of OFs in TAO patients was increased after exposed to sCD40L ($P<0.05$), and the increase was in a concentration- and time-dependent manner. **Conclusion** sCD40L can promote the proliferation of OFs and expression of HAS3 mRNA in patients with TAO, which implies that sCD40L plays an important role in the pathogenesis of TAO.

[Key words] soluble CD40 ligand; Graves ophthalmopathy; orbital fibroblasts; hyaluronan synthase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(10):1138-1142]

Graves 眼病又称甲状腺相关性眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO),常存在甲状腺

功能亢进或既往有 Graves 病伴甲状腺功能亢进史,发病年龄通常在 20~50 岁,女性发病率较男性

[收稿日期] 2015-05-07 **[接受日期]** 2015-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金(81371056)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81371056)。

[作者简介] 曾程程,硕士生。E-mail: zengcc_deng@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81885921, E-mail: ruiwei@126.com

高^[1]。TAO 与甲状腺功能异常密切相关,但其发病机制尚不完全清楚。CD40 分子是肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族的成员,表达于抗原提呈细胞、T 细胞和 B 细胞。CD40 分子可活化介导多条信号通路,参与细胞免疫和体液免疫。研究表明眼眶成纤维细胞(orbital fibroblasts, OFs)可表达 CD40,而 CD40 与其配体 CD40L 结合后刺激细胞因子如 IL-6、IL-8、COX-2、PGE2 的产生,提示 T 细胞参与的重要信号通路可诱导 OFs 活化和增殖^[2-5]。在对 TAO 发病机制的研究过程中发现,可溶性 CD40L(sCD40L)大量浸润于眼眶组织中,提示 sCD40L 与眼外肌纤维化相关^[6]。另有研究发现,TAO 患者血清中 sCD40L 的表达量明显高于正常人群^[7]。

透明质酸(hyaluronan, HA)是一类参与炎症反应的黏多糖,广泛分布于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中。HA 不仅参与细胞的迁移、增生和分化,同时还影响淋巴细胞和巨噬细胞的功能以及细胞间的相互作用。HA 由透明质酸合成酶(hyaluronan synthase, HAS)催化合成^[8]。目前已成功克隆了 3 种 HAS 基因,分别编码 3 种酶蛋白 HAS1、HAS2、HAS3^[9]。研究发现,TAO 患者眼眶组织中 HAS1 和 HAS3 mRNA 表达量明显高于正常人^[10],但 sCD40L 对 HAS mRNA 表达的影响尚未见报道。本研究采用 sCD40L 刺激体外培养的 TAO 患者和正常对照的 OFs,以 MTS 比色法测定 sCD40L 对 OFs 增殖的影响,并比较 sCD40L 刺激后 OFs 中 HAS 基因表达谱的变化,探讨 sCD40L 在 TAO 发病过程中的病理生理作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM(Gibco),胎牛血清(Gibco),MTS(Promega),sCD40L(Promega),TRIzol(Invitrogen),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa),SYBR Premix EX Taq 试剂盒(TaKaRa),PCR 扩增热循环仪(Perkin Elmer),CO₂ 培养箱(Hereus)、自动酶联免疫测定仪(Bio-Rad)。

1.2 OFs 来源 OFs 来源于 5 例 TAO 患者及 3 例正常对照。5 例 TAO 患者均符合 TAO 的诊断标准,其中男 1 例、女 4 例,暴露性角膜炎 3 例、压迫性

视神经病变 2 例。患者术前采用甲泼尼龙激素冲击治疗,效果欠佳,因严重的暴露性角膜溃疡和复视等要求手术治疗,并且符合手术指征。患者行开眶减压术时,取眶内结缔组织和部分眼外肌。正常对照组 3 例,男 2 例、女 1 例,为角膜穿通伤并要求义眼植入的患者,于眼球摘除术中取相应组织。以上取材均排除其他免疫性和炎症性疾病。均获得患者知情同意。

1.3 OFs 培养和鉴定 无菌条件下取眼眶结缔组织及眼外肌,剔除较大的血管和脂肪,将其剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块,均匀地置入培养瓶瓶壁,翻转培养瓶,瓶底向上,瓶内加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液(青霉素 10 万 U/mL、链霉素 4 万 U/mL)10 mL,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中。24 h 后,组织块贴附于瓶壁上,将培养瓶翻转平放,静置继续培养,每 2~3 d 换液 1 次。待单层细胞覆盖大部分瓶壁时,用 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化传代,每 4~6 d 传代 1 次。传代后细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液继续培养。取处于对数生长期、生长良好的细胞,在倒置相差显微镜下观察其活体形态,进行细胞鉴定,并取 4~9 代作为实验用细胞。

1.4 sCD40L 对 OFs 增殖的影响 取同代对数生长期细胞,充分消化后,稀释成 1×10^4 个细胞/mL 密度的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μ L (2 000 个细胞),5% CO₂、37℃ 下培养 24 h,使细胞贴壁生长,然后换为无血清培养液培养 24 h,使细胞生长同步化,并消除血清对细胞增殖的影响。实验组分别给予含不同浓度 sCD40L(终质量浓度为 6.25、12.5、25、50、100、200 ng/mL)的 DMEM 培养液,对照组不加 sCD40L,每个浓度设 3 个复孔,各孔血清终浓度为 5%。继续培养 48 h 后采用 MTS 比色法检测,每孔加入 10 μ L 的 MTS 溶液,继续培养 2 h 后酶联免疫检测仪测定光密度(D)值,测定波长为 450 nm,重复 3 次。

1.5 sCD40L 对 OFs 中 HAS mRNA 表达的影响 取同代对数生长期细胞,充分消化后,稀释成 1×10^4 个细胞/mL 密度的单细胞悬液,接种于 12 孔培养板,每孔 2 mL (20 000 个细胞),5% CO₂、37℃ 下培养 24 h,使细胞贴壁生长,然后换为无血清培养液培养 24 h。分别给予含不同浓度 sCD40L(终

质量浓度为 12.5、25、50、100 ng/mL)的 DMEM 培养液,空白对照不加 sCD40L,继续培养 3、6、12、24 h 后收集细胞。各浓度和(或)时点均设 3 个复孔。提取细胞总 RNA,反转录后用荧光定量 PCR 仪检测目的基因的表达。所用引物序列(GenePharma)见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

名称	序列
HAS1-F	5'-GTCCTCTAGGCCTATATAGGA-3'
HAS1-R	5'-CTGGAGGTGTACTIONTGGTAGCA-3'
HAS2-F	5'-GTACAGGTTTGTGATTCAGACACT-3'
HAS2-R	5'-GAGATCCAGGAATCGTACTTGT-3'
HAS3-F	5'-CTCGTGCATCATGCAGAAGT-3'
HAS3-R	5'-CAGAGTCGCACACCTGGA-3'
β actin-F	5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC-3'
β actin-R	5'-CTGGGCCTCGTCGCCACATA-3'

HAS: 透明质酸合成酶

1.6 统计学处理 采用 Graphpad prism 5.0 统计软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 sCD40L 促进 TAO 患者 OFs 增殖 图 1A 显示,给予 25 ng/mL 及以上浓度 sCD40L 刺激可促进 TAO 患者 OFs 增殖,并且该作用存在饱和现象,在 100 ng/mL 浓度达到最大刺激作用,增大浓度至 200 ng/mL 细胞数量并无明显增加;图 1B 显示,50 ng/mL 及以上浓度的 sCD40L 才可以促进正常对照 OFs 增殖,且该作用较弱并存在饱和现象。以上结果说明 sCD40L 对 TAO 患者 OFs 有更加明显的促增殖作用。

2.2 sCD40L 促进 TAO 患者 OFs 中 HAS3 mRNA 表达

2.2.1 量效关系 经 12.5~100 ng/mL 浓度的 sCD40L 处理 24 h 后,TAO 患者 OFs 的 HAS1 和 HAS2 mRNA 表达无明显变化;而 HAS3 mRNA 表达量随着 sCD40L 浓度加大而增加,100 ng/mL sCD40L 刺激 OFs 24 h 可使 HAS3 mRNA 的表达量增大为对照组的 6 倍(图 2A)。但正常对照 OFs 经 12.5~100 ng/mL 的 sCD40L 处理 24 h 后,其 HAS1、HAS2 和 HAS3 mRNA 的表达均无明显变

化(图 2B)。

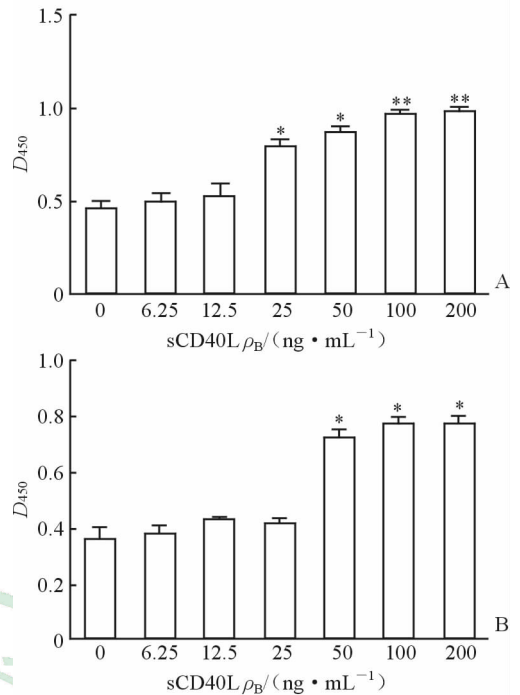


图 1 sCD40L 对 TAO 患者(A)和正常对照(B)OFs 增殖的影响 TAO: 甲状腺相关性眼病; OFs: 眼眶成纤维细胞。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与空白对照(0 ng/mL)比较。 $n=3$, $\bar{x} \pm s$

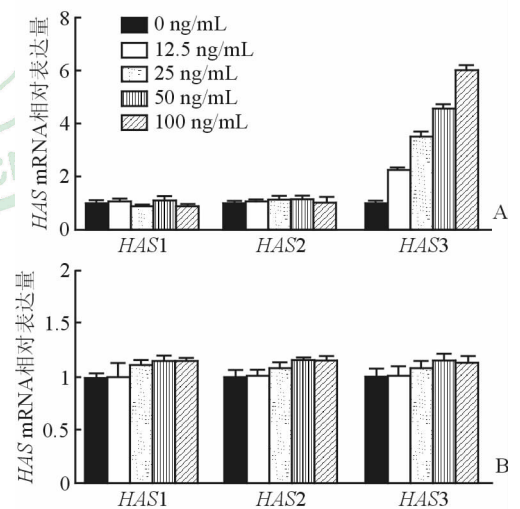


图 2 不同浓度的 sCD40L 作用 24 h 对 TAO 患者(A)和正常对照(B)OFs 中 HAS mRNA 表达的影响

TAO: 甲状腺相关性眼病; OFs: 眼眶成纤维细胞; HAS: 透明质酸合成酶。 $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.2.2 时效关系 图 3 显示,经 50 ng/mL 的 sCD40L 处理后,TAO 患者 OFs 的 HAS1、HAS2 mRNA 表达量于各时间点无明显变化,而 HAS3 mRNA 表达量呈现出明显的时间依赖趋势,24 h 时约为空白对照的 4.5 倍。

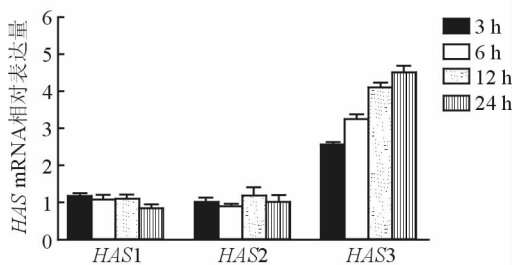


图 3 50 ng/mL sCD40L 处理不同时间后对 TAO 患者 OFs 中 HAS mRNA 表达量的影响

TAO: 甲状腺相关性眼病; OFs: 眼眶成纤维细胞; HAS: 透明质酸合成酶. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

TAO 是一种器官特异性自身免疫性疾病, 确切的发病机制目前尚不清楚。早期的病理改变是淋巴细胞、浆细胞以及各种炎性因子局部浸润于眼眶结缔组织, 我们前期研究发现反映慢性疾病炎性反应的重要指标红细胞分布宽度与 TAO 患者病情相关^[11], 也间接证明炎性反应在 TAO 的发病中具有重要作用。在探究 TAO 发病机制过程中发现, OFs 既是自身免疫靶细胞又是效应细胞, 当受到炎性因子刺激后, 不仅参与眼外肌纤维化, 同时还参与了眼眶脂肪形成以及透明质酸的堆积; OFs 作为靶细胞被激活, 活化后分泌氨基葡聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs), 具有亲水性的 GAGs 能使组织水肿, 导致眼球后组织肿胀, 严重者导致眼球向前突出^[12-13]。

研究发现当甲状腺功能调节异常时, 大量促甲状腺激素受体 (TSHR) 抗体与 TSHR 结合, 激活下游信号, 并通过介导信号通路激活 NF- κ B、MAPK、ERKs 等蛋白激酶, 促进细胞因子、生长因子、黏附分子 (CD54/CD106)、基质金属蛋白酶等的表达。此时大量免疫细胞 (如 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、抗原提呈细胞等) 通过体循环浸润眼眶组织并各司其职。当免疫系统被过度激活时, 抗原提呈细胞和活化的巨噬细胞能产生 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β , 不断加重炎性反应过程。T 细胞能够产生不同的细胞因子包括干扰素 γ 和 IL-4 γ , 另外, 活化的 T 细胞可以刺激 OFs, 使 MHC II 高表达, 呈递自身抗原。其中 CD40-CD40L 共刺激通路是介导 T 细胞激活 OFs 的关键, 在 TAO 发病机制中起着至关重要的作用^[2-5]。本实验发现 sCD40L 能促进 OFs 的增殖, 提

示在眼眶组织纤维化区域集中分布的 sCD40L 可能是通过刺激 OFs 的生长, 加强 OFs 在 TAO 病理过程中的作用。

TAO 患者球后组织有大量 ECM 聚集, 而 HA 是 OFs 合成的 ECM 的主要成分, 并且血清 HA 水平与 TAO 活动度有关^[14]。目前为止已经发现并克隆了 3 种 HA 合成酶基因, 分别编码 3 种同工酶 HAS1、HAS2 和 HAS3 蛋白。虽然这 3 种同工酶具有同源性, 但各自合成的 HA 相对分子质量不同, 且功能也存在差异。高相对分子质量的 HA 主要由 HAS1 和 HAS2 合成, 主要参与抑制炎症反应; 低相对分子质量的 HA 则主要由 HAS3 合成, 参与炎症反应, 是重要的炎性介质。以上 3 种 HAS 基因的表达受多种生长因子和细胞因子的影响, 而 TAO 患者眼眶结缔组织中弥漫浸润多种细胞因子和生长因子, 因此有可能通过影响患者眼眶组织中 HAS 基因的表达参与 TAO 病理生理过程。有研究表明胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 不影响培养的 OFs 中 HAS1 mRNA 的表达, 但能明显抑制 HAS2 mRNA 的表达, 增加 HAS3 mRNA 的表达, 提示 IGF-1 可能通过调节不同 HAS mRNA, 使 OFs 合成低相对分子质量 HA 的比例和数量增高, 引起 TAO 患者眼眶组织 HA 的堆积和炎性反应过程^[15]。本实验发现, 在 sCD40L 作用下, TAO 患者 OFs 中 HAS1 和 HAS2 mRNA 的表达无明显变化, 而 HAS3 mRNA 的合成增加, 并且呈现出浓度和时间依赖的趋势。由于 HAS3 主要催化合成低相对分子质量 HA, 而后者是一种重要的炎症介质, 故可能加重 TAO 患者眼眶局部组织的炎症反应和病情, 提示 sCD40L 可能通过促进 HAS3 mRNA 的表达来促进 TAO 患者 OFs 合成和分泌 HA, 从而促进 TAO 的发生和发展。

[参考文献]

- [1] Bahn R S. Graves' ophthalmopathy[J]. N Engl J Med, 2010, 362: 726-738.
- [2] Hwang C J, Afiffyan 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.
- [3] Sempowski G D, Rozenblit J, Smith T J, Phipps R P.

- Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(3 Pt 1): C707-C714.
- [4] Aoki-Ota M, Kinoshita M, Ota T, Tsunoda K, Iwasaki T, Tanaka S, et al. Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model[J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126: 105-113.
- [5] Gillespie E F, Raychaudhuri N, Papageorgiou K I, Atkins S J, Lu Y, Charara L K, et al. Interleukin-6 production in CD40-engaged fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy: involvement of Akt and NF- κ B[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 7746-7753.
- [6] Myśliwiec J, Waligórski D, Nikołajuk A, Górska M. Soluble CD40 and its ligand CD154 in patients with Graves' ophthalmopathy during combined therapy with corticosteroids and teloradiotherapy[J]. *Adv Med Sci*, 2007, 52: 104-108.
- [7] Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, Aubry J P, Elson G, Edgerton M D, et al. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 5965-5967.
- [8] Pappa A, Jackson P, Stone J, Munro P, Fells P, Pennock C, et al. An ultrastructural and systemic analysis of glycosaminoglycans in thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *Eye (Lond)*, 1998, 12 (Pt 2): 237-244.
- [9] Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 25085-25092.
- [10] Kaback L A, Smith T J. Expression of hyaluronan synthase messenger ribonucleic acids and their induction by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts: potential insight into the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84: 4079-4084.
- [11] 曾程程,魏锐利,牟旆,王秋红. 红细胞分布宽度与甲状腺相关性眼病相关[J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36:680-684.
- Zeng C C, Wei R L, Mou P, Wang Q H. Red blood cell distribution width is elevated in patients with Grave's ophthalmopathy [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2015,36:680-684.
- [12] Kazim M, Goldberg R A, Smith T J. Insights into the pathogenesis of thyroid-associated orbitopathy: evolving rationale for therapy[J]. *Arch Ophthalmol*, 2002, 120: 380-386.
- [13] Gould D J, Roth F S, Soparkar C N. The diagnosis and treatment of thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2012, 36: 638-648.
- [14] 何伟,刘英. HA和IGF-1检测对甲状腺相关性眼病活动度的评价[J]. *标记免疫分析与临床*, 2014, 21: 401-404.
- [15] 杨俊峰. IGF-1和生长抑素对眼眶成纤维细胞增殖和透明质酸合成酶基因表达影响的实验研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.

[本文编辑] 孙岩