

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.10.1239

# 香烟烟雾提取物及尼古丁诱导甲状腺相关眼病患者眼眶成纤维细胞氧化应激反应并上调 NF- $\kappa$ B 表达

王秋红, 曾程程, 牟 旆, 高连娣, 沈 亚, 魏锐利\*

第二军医大学长征医院眼科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨香烟烟雾提取物(CSE)及尼古丁对甲状腺相关眼病(TAO)氧化应激的影响,并以 NF- $\kappa$ B 为靶点探索其可能的分子机制。**方法** 取 5 例无吸烟史的 TAO 患者和 3 例无吸烟史的因其他原因行眼外科手术的患者(对照患者)的眼外肌组织,原代培养眼外肌来源的眼眶成纤维细胞(OFs)。将 OFs 经 10% CSE、0.5  $\mu$ g/mL 尼古丁、10  $\mu$ g/mL 尼古丁分别作用,即为 CSE 组、低浓度尼古丁组和高浓度尼古丁组。分别培养 24、72 h 后分别采用 MTT 法、ELISA 法和分光光度计法检测各组细胞活性、8-羟脱氧鸟苷(8-OHdG)水平及丙二醛(MDA)含量;24 h 后采用酶标仪法检测活性氧(ROS)水平,RT-PCR 法检测 NF- $\kappa$ B mRNA 水平。**结果** 干预 24 及 72 h 后,TAO 患者及对照患者 OFs 的细胞活力在 CSE 作用下均下降( $P < 0.05$ ),且 TAO 患者对 OFs 更敏感。高浓度尼古丁干预 24 h 后,TAO 患者 OFs 的 8-OHdG 水平增加( $P < 0.05$ );低浓度尼古丁干预 72 h 时,OFs 的 8-OHdG 水平也增加( $P < 0.05$ )。TAO 患者及对照患者 OFs 经 CSE 或不同浓度尼古丁干预 72 h 后的 MDA 含量均增加( $P < 0.01$ )。高浓度尼古丁干预 24 h 后,TAO 患者 OFs 中 ROS 水平上升( $P < 0.01$ )。CSE 干预 24 h 后,TAO 患者 OFs 中 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达上升( $P < 0.05$ );而对照患者 OFs NF- $\kappa$ B mRNA 的表达经 CSE 及高浓度尼古丁干预后下降( $P < 0.05$ )。**结论** 吸烟可通过激活 TAO 患者 OFs 的氧化应激参与 TAO 的病理过程,即使吸烟量较少,经时间累积也可能发挥作用,其机制可能是通过上调 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达来实现的。

**[关键词]** 吸烟;尼古丁;氧化性应激;NF- $\kappa$ B;甲状腺相关眼病**[中图分类号]** R 581.11**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2016)10-1239-06

## Cigarette smoke extract and nicotine induce oxidative stress and up-regulate NF- $\kappa$ B expression in orbital fibroblasts of patients with thyroid-associated ophthalmopathy

WANG Qiu-hong, ZENG Cheng-cheng, MOU Pei, GAO Lian-di, SHEN Ya, WEI Rui-li\*

Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To discuss the impact of cigarette smoke extract (CSE) and nicotine on the oxidative stress in thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) and to explore the possible molecular mechanism involving NF- $\kappa$ B signal pathway. **Methods** The orbital fibroblasts (OFs) were originally generated from 5 patients without smoking history and 3 volunteers without smoking history and were identified by using immunohistochemistry. Primary cultured extraocular muscle OFs were stimulated with 10% CSE (10% CSE group), 0.5  $\mu$ g/mL nicotine (low-concentration nicotine group) or 10  $\mu$ g/mL nicotine (high-concentration nicotine group). MTT assay, ELISA and spectrophotometer method were used to determine the changes of cell activity, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels and malondialdehyde (MDA) contents after intervention for 24 h and 72 h. ELISA was used to determine reactive oxygen species (ROS) level after 24 h culture, while RT-PCR was used to determine NF- $\kappa$ B mRNA expression. **Results** After intervention for 24 h and 72 h, the cell activities of OFs were significantly decreased after intervention with CSE in both TAO patients and healthy volunteers ( $P < 0.05$ ), with the OFs of TAO patients being more sensitive. After intervention for 24 h, the 8-OHdG level was significantly increased in TAO patients' OFs treated with high-concentration nicotine ( $P < 0.05$ ); for a longer intervention duration of 72 h, the 8-OHdG level was also significantly increased in the group treated with low-concentration nicotine ( $P < 0.05$ ). After intervention with CSE, low- and high-concentration nicotine for 72 h, MDA contents were increased significantly in both OFs groups ( $P < 0.01$ ). After intervention for 24 h, the ROS content was significantly increased in the TAO patients' OFs treated with high-concentration nicotine than in the untreated

**[收稿日期]** 2016-04-18 **[接受日期]** 2016-07-03**[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]** 王秋红,硕士生。E-mail: qiu hongw1987@163.com

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

group ( $P < 0.01$ ). After intervention for 24 h, the expression of *NF- $\kappa$ B* mRNA was significantly up-regulated after stimulation with CSE in the OFs of TAO patients than that in the untreated group ( $P < 0.05$ ); while the expression of *NF- $\kappa$ B* mRNA was significantly decreased in OFs stimulated with CSE and high-concentration nicotine compared with untreated group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Smoking may influence TAO pathological process through stimulating oxidative stress in OFs of TAO patients, and the stimulation may accumulate and sustain even if the smoking is slight, which may be related to up-regulation of *NF- $\kappa$ B* mRNA expression.

**[Key words]** smoking; nicotine; oxidative stress; *NF- $\kappa$ B*; thyroid-associated ophthalmopathy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(10): 1239-1244]

甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是一种与自身免疫和炎症相关的疾病,在成年人眼眶病中最为常见<sup>[1]</sup>,其发病机制复杂且不明确。目前针对 TAO 活动期的治疗手段主要为应用糖皮质激素<sup>[2]</sup>、局部放射<sup>[3-4]</sup>等对症方法。TAO 的影响因素很多,包括遗传因素、种族、年龄、性别、放射性碘治疗、吸烟等,其中吸烟是 TAO 的重要影响因素<sup>[5-6]</sup>。流行病学研究发现,吸烟增加了 TAO 的发病率,也增加了重度 TAO 的发病风险<sup>[5]</sup>,还有可能增加 TAO 的复发率<sup>[7]</sup>。

氧化应激(oxidative stress, OS)是细胞损害的重要因素之一,其在 TAO 的病理过程中发挥了重要的作用。TAO 患者外周血中 OS 指标明显升高,甲状腺功能正常型 TAO 患者外周血中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的含量也高于正常人群<sup>[8]</sup>,而且 ROS 可以刺激体外培养的 TAO 患者眼眶成纤维细胞(orbital fibroblasts, OFs)增殖且呈剂量相关性<sup>[9]</sup>。

在吸烟 TAO 患者的尿液中,尼古丁代谢产物可替宁的含量和 TAO 的严重程度呈剂量相关性<sup>[10]</sup>。香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)可以激活巨噬细胞核因子- $\kappa$ B (*NF- $\kappa$ B*)通路,增加小鼠巨噬细胞细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1)的表达<sup>[11]</sup>,但 CSE 是否对 OFs 有相似作用尚未得到证明。有学者提出通过应用烟雾与糖皮质激素拮抗性刺激 *NF- $\kappa$ B* 通路,从而减弱吸烟患者对于激素治疗的反应<sup>[12]</sup>,但其具体机制尚不明确。

综上所述,吸烟作为 TAO 发病及进展中的首要危险因素,其与 TAO 的关系异常紧密,而 OS 作为 TAO 的一项重要病理机制,也可以通过多种途径参与 TAO 的病理过程。本研究通过检测 OS 指标 ROS、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及 8-羟脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)的水平,探索 CSE 及尼古丁对 TAO 患者 OFs OS 作用的影响,检测 CSE 及尼古丁对 OFs *NF- $\kappa$ B* 通路的作用,并探索其作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶购自美国 Gibco 公司,香烟购自江苏中烟工业有限责任公司,8-OHdG、MDA、ROS 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;3111 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermo),Mastercycler ep realplex PCR 扩增热循环仪(Eppendorf),2000c 核酸定量检测仪(NanoDrop)。

1.2 眼外肌来源 TAO 组患者的眼外肌来源于 2015 年 1 月至 2015 年 3 月在第二军医大学长征医院眼科行斜视矫正术的患者,共 5 例 5 眼,男性 3 例、女性 2 例,年龄 39~71 岁,符合 TAO 诊断标准,排除其他自身免疫病,所有患者均无吸烟史或已戒烟 2 年以上,术中根据患者病情需要取得标本。对照组眼外肌来源于 2015 年 1 月至 2015 年 3 月在第二军医大学长征医院眼科行斜视矫正术及眼睑整形术的患者,共 3 例 3 眼,男性 2 例、女性 1 例,年龄 52~83 岁,排除其他眼病及自身免疫病,无吸烟史或已戒烟 2 年以上,术中根据患者病情需要取得标本。上述操作均经第二军医大学长征医院伦理委员会同意,取得患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.3 眼外肌来源 OFs 原代培养及鉴定 将手术获得的标本转移至存有 DMEM 培养液的离心管中,4 h 内运送至实验室。在超净台内将标本用 PBS 反复冲洗 3 次,用眼科剪剪成碎小组织块,将小组织块转移至新的无菌培养皿中,均匀平铺于皿底,盖好培养皿;在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的孵箱内倒置 5~6 h,待组织块贴壁后将培养皿轻轻翻转,沿边缘缓慢加入含体积分数为 20%胎牛血清的 DMEM 培养液 4~5 mL,静置培养。根据情况换液,平均 3~4 d 换液 1 次,4~10 d 可见梭形成纤维细胞从组织块周围爬出,及时观察细胞生长、贴壁状态和组织块周围细胞的融合状态。待组织块周围爬满细胞且基本融合时可进行传代。细胞株均经免疫组化法鉴定,取 4~9 代细胞用于后续实验。

1.4 CSE 的制备 多孔玻板吸接管中各加入

10 mL吸收液(水、甲醇、正己烷或二氯甲烷),滤嘴上放置一支香烟,连接好装置。打开大气采样器,流量调至约 75 mL/min,点燃香烟;抽至距过滤嘴约 0.25 cm 处,取下香烟,继续抽吸 2 min,尽量使残留在管路中的烟气可以被完全吸收。每次抽吸 3 支香烟,共抽吸 15 支。将吸收液转移至干净的 100 mL 玻璃瓶中,用 2 mL 吸收液洗涤吸接管 2 次,也转移至玻璃瓶中,定容至 35 mL,得到未浓缩的 CSE。吸收液通风橱中常温自然挥发,至体积约为 3 mL,用吸收液定容至 5 mL,过 0.45  $\mu$ m 滤器,转移分装至样品瓶中, -80  $^{\circ}$ C 保存。

1.5 CSE 和尼古丁对 OFs 细胞活性、8-OHdG、MDA、ROS 水平的影响 分别取 TAO 患者及对照患者来源的 4~9 代处于对数生长期的 OFs,消化成单细胞悬液,细胞计数后按照  $1 \times 10^6$  /mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 200  $\mu$ L。接种 24 h 后换液,各孔分别加入 10% CSE、0.5  $\mu$ g/mL 尼古丁、10  $\mu$ g/mL 尼古丁,即为 CSE 组、低浓度尼古丁组和高浓度尼古丁组,未加干预为阴性对照组。培养 24、72 h 后分别采用 MTT 法、ELISA、分光光度计法检测细胞活性、8-OHdG 水平及 MDA 含量,24 h 时用酶标仪法检测 ROS 水平。

1.6 RT-PCR 检测 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达变化 对

照患者及 TAO 患者 OFs 培养 24 h, TRIzol 法抽提总 RNA,并反转录成 cDNA, -70  $^{\circ}$ C 保存备用,以 GAPDH 作为内参基因,设计扩增引物,引物序列如下: GAPDH F 5'-GTG AAC GTC CGA GTC AAC G-3', R 5'-TGA GGT CAA TGA AGG GGT C-3'; NF- $\kappa$ B F 5'-GGA CCA GCA AAG GTT ATT GTT C-3', R 5'-TTA TAC ACG CCT CTG TCA TTC G-3'; 由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 循环条件。95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。采用 SDS 2.3 软件进行数据收集和分析,计算出标准化后的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  值。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用非配对 *t* 检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 CSE 对 OFs 活性的影响 经 CSE 干预 24、72 h 后,对照患者 OFs 活性较阴性对照组下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而 TAO 患者 OFs 活性在较阴性对照组下降更为明显( $P < 0.01$ );经 CSE 干预 24 h 后,TAO 患者与对照患者 OFs 活性差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 TAO 患者 OFs 对 CSE 作用更为敏感(图 1)。

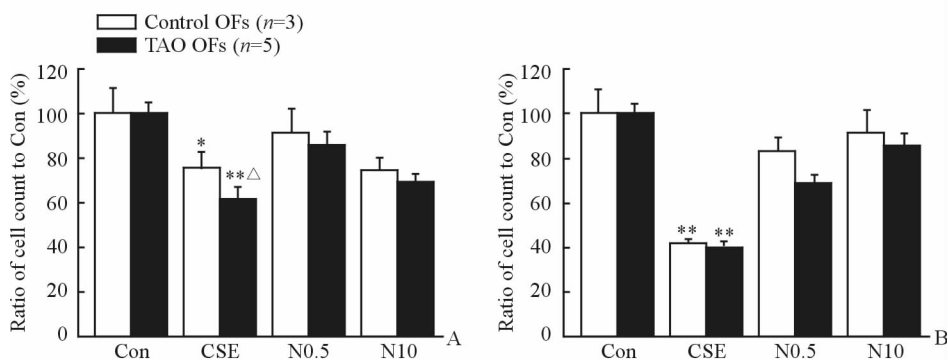


图 1 CSE 及尼古丁分别干预 OFs 24 h(A) 和 72 h(B) 后对细胞活性的影响

Fig 1 Effect of CSE and nicotine on cell viability in OFs at 24 h (A) and 72 h (B)

Con: Negative control; CSE: Cigarette smoke extract (10%); N0.5: Nicotine (0.5  $\mu$ g/mL); N10: Nicotine (10  $\mu$ g/mL). TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; OFs: Orbital fibroblasts. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Con group;  $\Delta$   $P < 0.05$  vs Control OFs group.  $\bar{x} \pm s$

2.2 CSE 和尼古丁对 OFs 的 MDA 含量的影响 CSE、不同浓度尼古丁干预 24 h 后,TAO 与对照患者 OFs 的 MDA 含量与阴性对照组相比差异均无统计学意义(图 2A)。而 CSE、不同浓度尼古丁干预 72 h 后,TAO 与对照患者 OFs 的 MDA 含量均增加( $P < 0.01$ );而 CSE 刺激条件下 TAO 患者与对照患者 OFs 的 MDA 含量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 TAO 患者 OFs 对 CSE 刺激更为敏感(图 2B)。

2.3 CSE 和尼古丁刺激对 OFs 的 8-OHdG 的影

响 结果(图 3)表明,TAO 患者及对照患者 OFs 在无干预条件下的 8-OHdG 基础水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。高浓度尼古丁干预 24 h(图 3A)后,TAO 患者 OFs 的 8-OHdG 水平较阴性对照组升高( $P < 0.05$ )。低浓度尼古丁干预 72 h(图 3B)后,TAO 患者 OFs 的 8-OHdG 水平较阴性对照组升高( $P < 0.05$ ),表明经时间累积后低浓度尼古丁也可以发挥作用。而对照患者 OFs 的 8-OHdG 水平经 CSE 干预后较阴性对照组增加( $P < 0.05$ )。

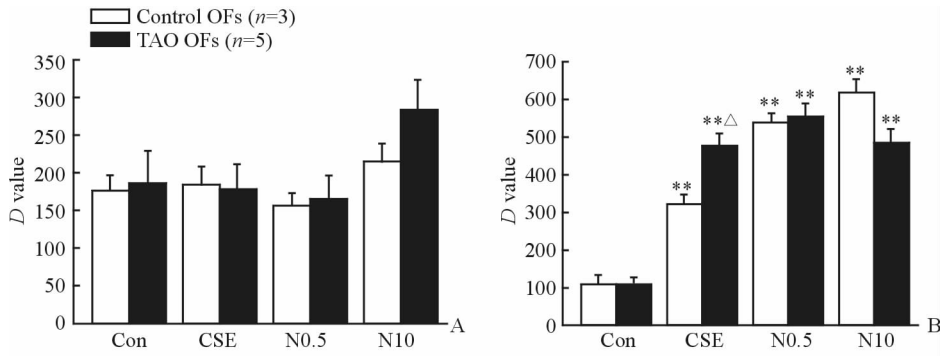


图2 CSE及尼古丁分别干预24 h(A)和72 h(B)对OFs MDA含量的影响

Fig 2 Effect of CSE and nicotine on MDA levels in OFs at 24 h (A) and 72 h (B)

Con: Negative control; CSE: Cigarette smoke extract (10%); N0.5: Nicotine (0.5 μg/mL); N10: Nicotine (10 μg/mL). TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; OFs: Orbital fibroblasts; MDA: Malondialdehyde. \*\* P < 0.01 vs Con group; △ P < 0.05 vs Control OFs group.  $\bar{x} \pm s$

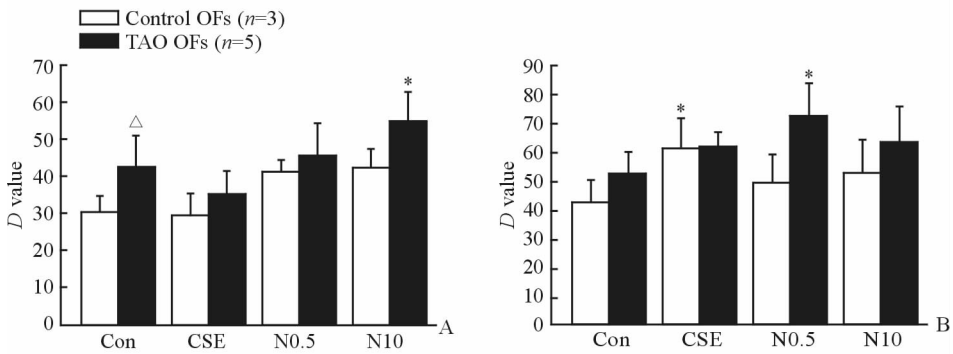


图3 CSE及尼古丁分别干预24 h(A)和72 h(B)对OFs 8-OHdG水平的影响

Fig 3 Effect of CSE and nicotine on 8-OHdG levels in OFs at 24 h (A) and 72 h (B)

Con: Negative control; CSE: Cigarette smoke extract (10%); N0.5: Nicotine (0.5 μg/mL); N10: Nicotine (10 μg/mL). TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; OFs: Orbital fibroblasts; 8-OHdG: 8-Hydroxydeoxyguanosine. \* P < 0.05 vs Con group; △ P < 0.05 vs Control OFs group.  $\bar{x} \pm s$

2.4 尼古丁刺激对OFs的ROS水平的影响 高浓度尼古丁干预24 h后,TAO患者OFs的ROS水平较阴性对照组上升(P < 0.01,图4)。

2.5 CSE和尼古丁刺激对OFs NF-κB表达的影响

干预24 h后,CSE TAO患者OFs中NF-κB mRNA的表达高于阴性对照组(P < 0.05);而对患者OFs CSE及高浓度尼古丁干预24 h后NF-κB mRNA的表达较阴性对照组均下降(P < 0.05,图5)。

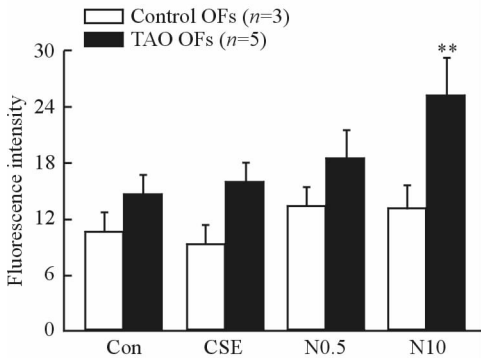


图4 CSE及尼古丁分别干预24 h对OFs ROS水平的影响

Fig 4 Effect of CSE and nicotine on ROS generation in OFs at 24 h

Con: Negative control; CSE: Cigarette smoke extract (10%); N0.5: Nicotine (0.5 μg/mL); N10: Nicotine (10 μg/mL). TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; OFs: Orbital fibroblasts; ROS: Reactive oxygen species. \*\* P < 0.01 vs Con group.  $\bar{x} \pm s$

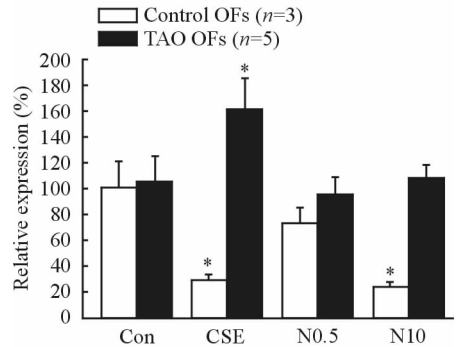


图5 CSE及尼古丁分别干预24 h对OFs NF-κB表达水平的影响

Fig 5 Effect of CSE and nicotine on NF-κB expression in OFs at 24 h

Con: Negative control; CSE: Cigarette smoke extract (10%); N0.5: Nicotine (0.5 μg/mL); N10: Nicotine (10 μg/mL). TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; OFs: Orbital fibroblasts. \* P < 0.05 vs Con group.  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

本研究以 CSE 和香烟中的主要成瘾性成分尼古丁作为刺激因素, 利用 TAO 患者以及对照患者的 OFs, 在细胞水平上研究吸烟对 TAO 的作用机制。结果发现, 单独给予 CSE 干预 24 h 后 TAO 患者 OFs 的细胞活力就已出现大幅度的下降, 而干预 72 h 后 TAO 患者 OFs 活力仍显著下降。可见 CSE 可在较短时间内对 TAO 患者 OFs 发挥较强的损伤作用, 随着时间累积, 该作用依然存在。TAO 患者 OFs 对 CSE 的作用相较于对照患者 OFs 更敏感, 提示 TAO 的病理状态使 OFs 自我保护功能下降, 导致其对吸烟的损害更敏感, 其机制可能是细胞外部环境激素等因子长期非正常表达使细胞内的一些通路长期处于非正常激活状态, 因此影响了 OFs 的正常代谢机制。Burch 等<sup>[13]</sup>研究发现, 长期甲状腺功能异常会增加成纤维细胞内 ROS 的产生, 导致成纤维细胞长期处于 OS 状态。Lu 等<sup>[14]</sup>通过对多个 TAO 患者临床样本的研究证实 IL-1 $\beta$  细胞分泌的黏性脂多糖会促进成纤维细胞内 ROS 含量的增加。

MDA 是细胞内非酶系统产生的氧自由基通过攻击生物膜中多不饱和脂肪酸引发的脂质过氧化物, 是间接检测非酶系统产生的氧自由基的有效方法。TAO 患者以及对照患者 OFs 在各种刺激因素干预 24 h 后 MDA 含量均无显著变化; 而干预 72 h 后, CSE 及高、低浓度尼古丁干预的 OFs 中 MDA 的含量均增加, 且 TAO 患者 OFs 对于 CSE 及低浓度尼古丁作用的敏感性强于对照患者 OFs, 可见 CSE 及尼古丁对 TAO 患者 OFs 的损伤机制与非酶系统产生的超氧化物细胞损伤机制有高度关联性。随着刺激时间的延长, 低浓度尼古丁和 CSE 干预的 OFs MDA 含量均显著增加, 表明吸烟对 TAO 的影响有一定的时间累积效应。

8-OHdG 是 ROS 攻击 DNA 分子中的鸟嘌呤碱基第 8 位碳原子而产生的一种氧化性加合物, 可作为 OS 对 DNA 损伤的检测指标。TAO 患者 OFs 中 8-OHdG 的基础表达水平高于对照患者 OFs, 且高浓度尼古丁干预 24 h 后, 可升高 TAO 患者 OFs 中 8-OHdG 的含量。随作用时间的延长, 低浓度尼古丁干预的 OFs 中 8-OHdG 的水平增加, 提示低浓度尼古丁可导致 8-OHdG 的缓慢积累, 而高浓度的

尼古丁则在短时间内即可促进 8-OHdG 的水平上升。提示尼古丁作用有一定的时间累积性, 即使日常吸烟量较小的 TAO 患者, 其疾病的发展也会受到吸烟的影响。

ROS 不仅是 OS 的重要指标, 也可通过介导 OFs 增殖在 TAO 的疾病过程中发挥作用。高浓度尼古丁干预后 TAO 患者 OFs 中 ROS 水平比阴性对照组上升, 而对照患者 OFs 中 ROS 的水平在相同刺激条件下变化差异无统计学意义, 说明尼古丁作为香烟的重要成分可通过 OS 反应参与 TAO 的病理过程。

NF- $\kappa$ B 作为一种重要的转录因子, 在炎症因子对细胞功能的调控<sup>[15]</sup>以及对 OS 的调控中<sup>[16]</sup>发挥重要作用。CSE 干预 24 h 后, TAO 患者 OFs 中 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达上调, 而尼古丁单独刺激对 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达无显著影响。Campo 等<sup>[17]</sup>报道脂质过氧化物可激活 NF- $\kappa$ B 和 Caspase 通路, 从而调控细胞存活状态。CSE 和尼古丁对于 MDA 含量的影响可能参与其中。TAO 患者和对照患者 OFs 中 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达在相同干预因素作用下相反, 说明该靶点可能只在 TAO 的发病机制中发挥作用, TAO 患者 OFs 受 CSE 中某种成分的影响, 从而上调 NF- $\kappa$ B 表达, 促进疾病发展, 其具体的机制尚待进一步探索。

综上所述, 本研究结果表明吸烟可导致 OFs 活性下降, 上调 OFs 各种 OS 指标, 可能通过激活 OS 参与 TAO 的病理过程, 其中尼古丁发挥了重要作用。吸烟的上述作用有一定的时间累积效应, 即使每日吸烟量较小, 经时间累积之后依然会起作用, 故在临床工作中应积极劝导患者戒烟, 而不是减少吸烟量。此外, 本研究表明吸烟可能通过介导 NF- $\kappa$ B 通路的激活而发挥作用, 其具体机制较为复杂, 尚需要进一步深入研究。

### [参考文献]

- [1] HIROMATSU Y, EGUCHI H, TANI J, KASAOKA M, TESHIMA Y. Graves' ophthalmopathy: epidemiology and natural history [J]. Intern Med, 2014, 53: 353-360.
- [2] MELCESCU E, HORTON W B, KIM D, VIJAYAKUMAR V, CORBETT J J, CROWDER K W, et al. Graves orbitopathy: update on diagnosis and

- therapy[J]. South Med J, 2014, 107: 34-43.
- [3] LERAY B, IMBERT P, THOUVENIN D, BOUTAULT F, CARON P. [Diagnosis and treatment of dysthyroid orbitopathy: a multidisciplinary disease] [J]. J Fr Ophthalmol, 2013, 36: 874-885.
- [4] VILAR-GONZÁLEZ S, LAMAS-OLIVEIRA C, FAGÚNDEZ-VARGAS M A, NÚÑEZ-QUINTANILLA AT, PÉREZ-ROZOS A, MERAYO-LLOVES J, et al. [Thyroid orbitopathy, an overview with special attention to the role of radiotherapy] [J]. Endocrinol Nutr, 2015, 62: 188-199.
- [5] STAN M N, BAHN R S. Risk factors for development or deterioration of Graves' ophthalmopathy [J]. Thyroid, 2010, 20: 777-783.
- [6] THORNTON J, KELLY S P, HARRISON R A, EDWARDS R. Cigarette smoking and thyroid eye disease: a systematic review [J]. Eye (Lond), 2007, 21: 1135-1145.
- [7] KIMBALL L E, KULINSKAYA E, BROWN B, JOHNSTON C, FARID N R. Does smoking increase relapse rates in Graves' disease? [J]. J Endocrinol Invest, 2002, 25: 152-157.
- [8] ZARKOVIĆ M. The role of oxidative stress on the pathogenesis of Graves' disease [J]. J Thyroid Res, 2012, 2012: 302537.
- [9] BARTALENA L, TANDA M L, PIANTANIDA E, LAI A. Oxidative stress and Graves' ophthalmopathy: *in vitro* studies and therapeutic implications [J]. Biofactors, 2003, 19(3/4): 155-163.
- [10] CZARNYWOJTEK A, ZGORZALEWICZ-STACHOWIAK M, FLOREK E, PIEKOSZEWSKI W, WARMUZ-STANGIERSKA I, KULIŃ SKA-NIEDZIELA I, et al. [The level of cotinine-marker of tobacco smoking, in patients with hyperthyroidism] [J]. Endokrynol Pol, 2006, 57: 612-618.
- [11] 许建英, 杜永成, 庞敏, 徐永健. 香烟烟雾提取物通过活化 NF- $\kappa$ B 上调小鼠巨噬细胞 ICAM-1 表达 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22: 1843-1845.
- [12] URSU H I, GHEORGHIU M L. Oxidative stress, nuclear factor- $\kappa$ B pathway and current smoking in Graves' ophthalmopathy [J]. Eur Thyroid J, 2013, 2: 69-70.
- [13] BURCH H B, LAHIRI S, BAHN R S, BARNES S. Superoxide radical production stimulates retroocular fibroblast proliferation in Graves' ophthalmopathy [J]. Exp Eye Res, 1997, 65: 311-316.
- [14] LU R, WANG P, WARTOFSKY L, SUTTON B D, ZWEIER J L, BAHN R S, et al. Oxygen free radicals in interleukin-1 $\beta$ -induced glycosaminoglycan production by retro-ocular fibroblasts from normal subjects and Graves' ophthalmopathy patients [J]. Thyroid, 1999, 9: 297-303.
- [15] MALDONADO M D, GARCÍA-MORENO H, GONZÁLEZ-YANES C, CALVO J R. Possible involvement of the inhibition of NF- $\kappa$ B factor in anti-inflammatory actions that melatonin exerts on mast cells [J]. J Cell Biochem, 2016, 117: 1926-1933.
- [16] ISMAIL N, ISMAIL M, IMAM M U, AZMI N H, FATHY S F, FOO J B, et al. Mechanistic basis for protection of differentiated SH-SY5Y cells by oryzanol-rich fraction against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 1-11.
- [17] CAMPO G M, AVENOSO A, CAMPO S, D'ASCOLA A, TRAINA P, SAMÀ D, et al. NF- $\kappa$ B and caspases are involved in the hyaluronan and chondroitin-4-sulphate-exerted antioxidant effect in fibroblast cultures exposed to oxidative stress [J]. J Appl Toxicol, 2008, 28: 509-517.

[本文编辑] 曾奇峰