

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00801

· 短篇论著 ·

甲状腺相关眼病眼眶结缔组织中共刺激分子 CD40/CD40L 的表达

Expression of CD40/CD40L costimulatory molecules in human orbital connective tissues of thyroid-associated ophthalmopathy

赵立全,程金伟,魏锐利*

第二军医大学长征医院眼科,上海 200003

[摘要] **目的** 观察甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy,TAO)患者眼眶结缔组织中共刺激分子 CD40/CD40L 的表达,并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用免疫组化检测 CD40/CD40L、细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule 1,ICAM-1)/白细胞功能抗原 1(leukocyte function antigen 1,LFA-1)在甲状腺相关眼病患者($n=12$)及正常对照($n=8$)眼眶组织中的表达情况;原代培养 TAO 患者及正常对照眼眶成纤维细胞,应用 RT-PCR 方法检测 CD40L 刺激后眼眶成纤维细胞合成 ICAM-1 mRNA 水平的变化。**结果** TAO 患者眼眶结缔组织中可见高表达 CD40、ICAM-1 的成纤维细胞,大量淋巴细胞浸润并高表达 LFA-1;双酶标组化显示 CD40 阳性表达的成纤维细胞周围浸润 CD40L 阳性表达的淋巴细胞;ICAM-1 阳性眼眶成纤维细胞与 LFA-1 阳性淋巴细胞以直接接触的形式存在。RT-PCR 结果显示,未激活状态 TAO 组眼眶成纤维细胞 ICAM-1 mRNA 水平高于正常组($P<0.05$);两组眼眶成纤维细胞经 CD40L 诱导后 ICAM-1 mRNA 水平高于未激活状态($P<0.05$);ICAM-1 mRNA 表达量与 CD40L 刺激呈剂量依赖关系。**结论** CD40/CD40L 共刺激分子在 TAO 患者眼眶结缔组织中高表达,可能在 TAO 眼眶淋巴细胞浸润及炎症发生、发展中起重要作用。

[关键词] Graves 眼病;眼眶;成纤维细胞;CD40 配体;细胞间黏附分子 1

[中图分类号] R 581.11

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)07-0801-04

共刺激分子参与了类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的病理过程^[1-2]。甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy,TAO)是一种器官特异性自身免疫病,其免疫病理表现为甲状腺及眼眶局部淋巴细胞浸润^[3]。眼眶结缔组织疾病中,尤其是眼眶成纤维细胞(orbital fibroblasts,OF)中存在共刺激分子 CD40 异常表达,而且 CD40 信号参与调节 T 细胞与眼眶成纤维细胞的相互作用^[4]。因此,本研究采用免疫组织化学染色方法观察一系列共刺激分子在甲状腺相关眼病眼眶结缔组织及原代培养眼眶成纤维细胞中的表达特征,探讨其可能的作用机制和临床意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料及标本获取 甲状腺相关眼病患者:2006年9月至2008年9月在第二军医大学长征医院因角膜溃疡或压迫视神经病变进行眼眶减压手术治疗的重症 TAO 患者 12 例,男 7 例,女 5 例,年龄 29~67 岁,平均(45.08±10.88)岁,病程 2.5~13.0 年,平均(5.63±2.98)年。NOSPECS 分级:Ⅴ级 3 例,Ⅵ级 9 例。静止期 TAO 患者 10 例,术前 1 个月内甲状腺功能正常,3 例行一壁开眶减压术(2 例下壁,1 例外侧壁),7 例行二壁开眶减压术(3 例外壁、下壁联合开眶减压,4 例内壁、下壁联合开眶减压)。活动期患者 2 例,视神经受压视力进行性下降,给予大剂量糖皮质激素全身治疗及眼

眶局部放疗后,症状缓解不明显,甲状腺功能经内科积极治疗稳定 1 个月后行眼眶减压术,2 例都采用外壁、下壁二壁联合开眶减压术。术中取眼眶结缔组织标本。正常对照:收集同期角膜移植捐献者正常新鲜眼眶结缔组织标本 8 例,男 5 例,女 3 例,年龄 25~59 岁,平均(42.88±11.02)岁,均排除甲状腺疾病、眼眶炎症及眼眶肿瘤等疾病,取球后结缔组织。以上操作均经第二军医大学长征医院医学伦理委员会批准,符合赫尔辛基宣言,取得患者及家属书面知情同意。

1.2 免疫组织化学染色法检测眼眶结缔组织中共刺激分子的表达 无菌操作下收集手术切除的 TAO 患者及正常眼眶结缔组织,经 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋、切片。CD40、CD40L、细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)和白细胞功能抗原 1(leukocyte function antigen 1, LFA-1)鼠抗人单克隆抗体为丹麦 Dako 公司产品,采用华美生物工程公司即用型 SP 免疫组化检测试剂盒标记染色,实验步骤按试剂盒说明书进行。CD40/CD40L、ICAM-1/LFA-1 双酶标免疫组织化学染色采用华美生物工程公司免疫组化检测试剂盒标记染色,染色步骤按试剂盒说明书进行。

1.3 眼眶成纤维细胞原代培养及 CD40L 诱导实验 无菌取材后的眼眶结缔组织用无菌磷酸缓冲液(PBS)冲洗,尽量剔除脂肪和血管样组织后,用眼科角膜剪将其剪成约 0.5 mm³ 的小组织块。加 0.25% 胰蛋白酶和 0.05% EDTA-Na₂

[收稿日期] 2009-12-01 **[接受日期]** 2010-03-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30672274)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30672274)。

[作者简介] 赵立全,博士,主治医师, E-mail: zhaoliquan2004@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885921, E-mail: ruiliwei@gmail.com

(1:1)的混合消化液,置于37℃温箱消化15 min。消化后反复吹打,滤过、离心、去除胰蛋白酶。用无血清 Eagle MEM 培养液洗1次,离心,最后加入含15%胎牛血清(FBS)的 Eagle MEM 培养液(含青霉素 G 100 U/ml 和链霉素 100 U/ml),将细胞制成混悬液,接种入培养瓶,常规培养。根据情况3~4 d 换液1次,待细胞长满瓶底80%~90%后传代。本实验所用细胞为3~7代。传代稳定后从形态学和免疫组化的层面对细胞进行鉴定,免疫组化染色可见 Vimentin 染色阳性,Desmin,Keratin,S100 染色均为阴性,证实为成纤维细胞。取生长良好的同代 TAO 与正常眼眶成纤维细胞制成细胞悬液,分别加入不同浓度的 sCD40L(5、10、50、100 ng/ml)作用1、2、4、8 h 后,收集细胞提取总 RNA。TNF- α (100 ng/ml)作为阳性对照组。

1.4 引物设计和合成 在 GenBank 检索 ICAM-1 基因全长序列,采用 Premier 5.0 软件设计引物,委托上海生工生物工程技术有限公司合成。ICAM-1(192 bp)引物序列为:上游 5'-AGC TTC TCC TGC TCT GCA ACC-3',下游 5'-ACA CTT GAG CTC GGG CAA TG-3'。内参照采用 β -actin(222 bp),引物序列为:上游 5'-GCG AGA AGA TGA CCC AGA TCA T-3',下游 5'-TGA GGT AGT CAG TCA GGT CCC G-3'。

1.5 RT-PCR 半定量测定 ICAM-1 mRNA 表达 TRIzol RNA 抽提试剂、反转录酶为 Gibco 公司产品。PCR 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司。按 RNA 试剂盒提取各组标本中 RNA,并取 10 μ g RNA 进行反转录。取反转录产物 cDNA 用上述合成的上下游引物分别进行 PCR 扩增,对比分析 ICAM-1 和 β -actin mRNA 表达水平。扩增条件均为:95℃变性 3 min;95℃15 s,60℃20 s,72℃30 s,循环 30 次;72℃延伸 3 min。取 PCR 产物 5 μ l,2%琼脂糖凝胶进行电泳,EB 染色,UV-200 紫外透射分析仪观察,用 NIH Scion Image 软件分析 PCR 产物,计算 mRNA 条带光密度值与相应 β -actin 条带光密度值的比值,以对照组为 1 进行比较。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学处理,免疫组化阳性率的比较采用 χ^2 检验;RT-PCR 半定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 眼眶结缔组织中共刺激分子的表达 12 例 TAO 患者眼眶结缔组织中均检测到 CD40/CD40L、ICAM-1/ LFA-1。其中 CD40 蛋白主要表达在眼眶结缔组织成纤维细胞的细胞膜上和细胞质上,以细胞膜为主,阳性呈黄褐色颗粒状。所有 TAO 标本均有程度不一的染色(阳性率为 37.5%),正常眼眶组织有微弱阳性染色(阳性率为 3.1%),组间差异有统计学意义($\chi^2 = 34.678, P < 0.01$;图 1)。ICAM-1 蛋白主要表达在 TAO 眼眶组织中成纤维细胞的细胞膜上和血管内皮细胞的细胞膜上,阳性呈黄褐色颗粒状(阳性率为 80.4%),正常眼眶组织有微弱染色,大多位于血管壁上(阳性率为 17.0%),组间差异有统计学意义($\chi^2 = 41.543, P < 0.01$;图 1)。CD40L、LFA-1 蛋白主要表达在 TAO 眼眶组织中浸润的淋巴细胞的细胞膜上和小血管中的淋巴细胞的

细胞膜上,阳性呈黄褐色颗粒状(阳性率为 48.7%、74.2%),正常眼眶组织中几乎未见染色(阳性率为 4.5%、8.2%),组间差异有统计学意义($\chi^2 = 21.475, \chi^2 = 45.861, P < 0.01$;图 1)。

双酶标免疫组化显示:(1)CD40/CD40L:CD40 蛋白主要表达在眼眶组织中成纤维细胞的细胞膜上,阳性呈棕红色颗粒状。CD40L 蛋白主要表达在眼眶组织中浸润的淋巴细胞的细胞膜上和小血管中的淋巴细胞的细胞膜上,阳性呈紫蓝色颗粒状。标本中可见表达 CD40 阳性的成纤维细胞周围浸润着表达 CD40L 的淋巴细胞,并且以直接接触的形式存在(图 2A)。(2)ICAM-1/LFA-1:ICAM-1 蛋白主要表达在眼眶组织中成纤维细胞的细胞膜上和血管内皮细胞的细胞膜上,阳性呈棕红色颗粒状。LFA-1 蛋白主要表达在眼眶组织中浸润的淋巴细胞的细胞膜上和小血管中的淋巴细胞的细胞膜上,阳性呈紫蓝色颗粒状。标本中可见表达 ICAM-1 阳性的成纤维细胞周围浸润着表达 LFA-1 的淋巴细胞,并且以直接接触的形式存在;LFA-1 阳性的淋巴细胞直接黏附于 ICAM-1 阳性的血管内皮细胞上(图 2B)。

2.2 RT-PCR 半定量结果 结果(图 3)表明:在未激活状态时,TAO 组眼眶成纤维细胞 ICAM-1 mRNA 水平高于正常组($P < 0.05$);经 CD40L 激活后,正常组和 TAO 组 ICAM-1 mRNA 水平都高于各自未激活状态($P < 0.05$)。TAO 组眼眶成纤维细胞经不同剂量 CD40L 刺激后 ICAM-1 mRNA 表达(图 4A)显示,CD40L 浓度为 5~10 ng/ml 时,细胞内 ICAM-1 mRNA 水平无明显变化;CD40L 浓度为 50 ng/ml 时,细胞内 ICAM-1 mRNA 水平升高($P < 0.01$);CD40L 浓度为 100 ng/ml 时,细胞内 ICAM-1 mRNA 水平达到峰值水平($P < 0.01$)。TAO 组眼眶成纤维细胞经 100 ng/ml CD40L 刺激后 1 h,ICAM-1 mRNA 水平未发生明显性升高,2 h mRNA 水平升高达到最高值($P < 0.01$),其后 mRNA 水平逐渐下降,但在最后 8 h 时,其 mRNA 水平仍高于未激活组($P < 0.01$,图 4B)。

3 讨论

眼眶成纤维细胞在 TAO 的发生和发展中起中心作用,既是靶细胞,又是效应细胞,表现出多种功能^[3-4]。CD40-CD40L 在眼眶成纤维细胞和 T 淋巴细胞相互作用引起 TAO 的发病中起重要作用,通过黏附分子进入眼眶组织的 T 淋巴细胞可释放多种细胞因子,以刺激眼眶成纤维细胞发生增殖,并通过 CD40-CD40L 信号通路上调糖胺多糖(glycosaminoglycan,GAG)合成和许多免疫调节因子的表达^[5-7]。体外培养的 OF 经 IFN- γ 激活后细胞表面 CD40 上调性表达^[8],提示 TAO 眼眶成纤维细胞受 IFN- γ 等细胞因子的刺激而上调表达共刺激分子 CD40,通过 CD40-CD40L 信号通路介导 B 细胞的活化,启动眼眶组织自身免疫应答。

本研究的免疫组织化学结果发现 TAO 患者成纤维细胞 CD40 的表达比正常人要高;眼眶组织小血管及毛细血管中存在大量 CD40L 阳性淋巴细胞,并且这种 CD40L 强阳性的淋巴细胞弥漫性浸润在眼眶成纤维细胞、脂肪细胞周围。双酶标法免疫组化染色结果显示,CD40 阳性表达的成纤维周围浸润

CD40L 阳性表达的淋巴细胞, 并且以直接接触的形式存在。

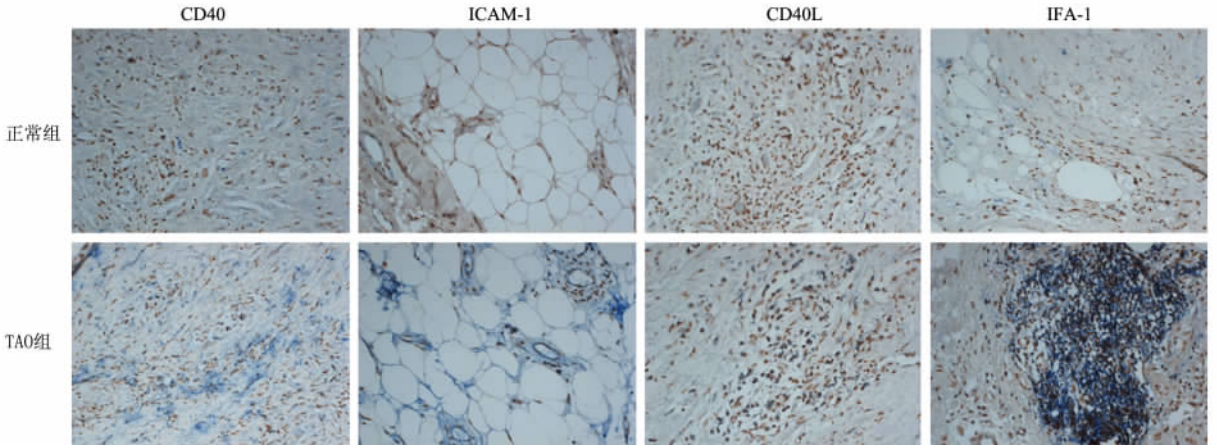


图 1 TAO 与正常眼眶结缔组织中 CD40、ICAM-1、CD40L、LFA-1 染色

Original magnification: $\times 400$

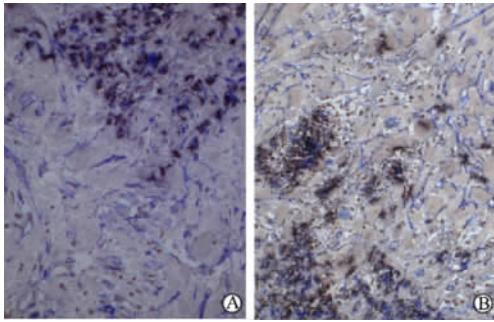


图 2 TAO 组眼眶结缔组织 CD40/CD40L (A)、ICAM-1/LFA-1 (B) 双酶标染色

Original magnification: $\times 400$

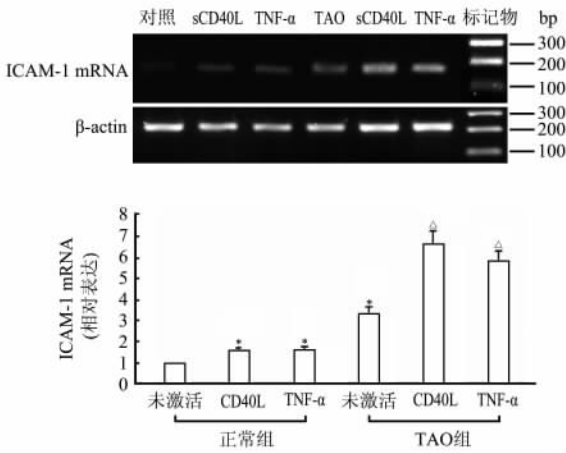


图 3 眼眶成纤维细胞经 CD40L (100 ng/ml) 作用 2 h 后 ICAM-1 mRNA 的表达变化

* $P < 0.05$ 与未激活正常组比较; $\Delta P < 0.05$ 与未激活 TAO 组比较; $n = 3, \bar{x} \pm s$

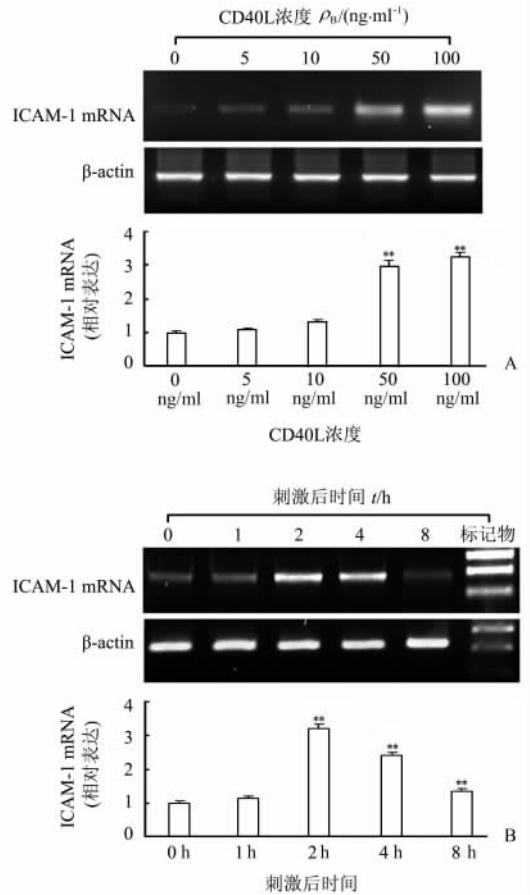


图 4 CD40L 刺激后 TAO 眼眶成纤维细胞 ICAM-1 mRNA 的表达变化

A: 不同浓度 CD40L (0、5、10、50、100 ng/ml) 刺激眼眶成纤维细胞 2 h 后 ICAM-1 mRNA 的表达变化; B: 100 ng/ml CD40L 分别刺激眼眶成纤维细胞 0、1、2、4、8 h 后 ICAM-1 mRNA 的表达变化. ** $P < 0.01$ 与未激活组比较; $n = 3, \bar{x} \pm s$

ICAM-1是最早发现的免疫球蛋白超家族黏附分子之一,其配体为LFA-1,两者结合后表达细胞激活所必需的协同共刺激信号从而介导T-T细胞、T细胞与基质细胞、效应细胞与靶细胞间的相互作用,因而在炎症反应中起主要作用^[10]。活动期TAO患者血清中可溶性黏附分子sICAM-1升高,而经过糖皮质激素治疗后,血清sICAM-1水平显著性下降,说明ICAM-1在眼眶的免疫性炎症反应的进程中扮演了十分重要的角色^[11-12]。本研究的免疫组化结果还证实,TAO患者眼眶结缔组织成纤维细胞高表达ICAM-1及眼眶浸润的淋巴细胞表达LFA-1强阳性,双酶标免疫组化法显示ICAM-1强阳性的眼眶成纤维细胞与LFA-1强阳性淋巴细胞以直接接触的形式存在。结果提示:TAO患者眼眶组织ICAM-1表达强阳性,眼眶组织中成纤维细胞和血管内皮细胞表达量比较高,并且ICAM-1强阳性的成纤维细胞和血管内皮细胞周围聚集大量LFA-1强阳性的淋巴细胞。Heufelder等^[9]通过免疫组化与单克隆抗体技术在TAO患者的球后组织中检测到ICAM-1高表达于血管与眼外肌纤维的肌束膜及眼外肌周围结缔组织中。这进一步证明黏附分子免疫球蛋白超家族在T淋巴细胞介导的TAO眶部免疫反应中的重要作用。

本研究表明TAO患者眼眶成纤维细胞经CD40L刺激后,其细胞分泌的ICAM-1明显上调,并且这种增强作用随CD40L的浓度呈剂量依赖性和时间依赖性,与以往研究结果^[7,13]类似。结果提示,TAO患者眼眶由于淋巴细胞的浸润、黏附,通过CD40-CD40L刺激眼眶成纤维细胞高表达ICAM-1,而高表达ICAM-1的成纤维细胞进一步加强了与表达LFA-1淋巴细胞的黏附作用,从而促进炎症的发生与发展。

[参考文献]

- [1] Kitagawa M, Suzuki H, Adachi Y, Nakamura H, Yoshino S, Sumida T. Interferon-gamma enhances interleukin 12 production in rheumatoid synovial cells *via* CD40-CD154 dependent and independent pathways[J]. *J Rheumatol*, 2001, 28: 1764-1771.
- [2] Higuchi T, Aiba Y, Nomura T, Matsuda J, Mochida K, Suzuki M, et al. Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease[J]. *J Immunol*, 2002, 168: 9-12.
- [3] Gianoukakis A G, Khadavi N, Smith T J. Cytokines, Graves' disease, and thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *Thyroid*, 2008, 18: 953-958.
- [4] Lehmann G M, Feldon S E, Smith T J, Phipps R P. Immune

mechanisms in thyroid eye disease[J]. *Thyroid*, 2008, 18: 959-965.

- [5] 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.
- [6] Cao H J, Wang H S, Zhang Y, Lin H Y, Phipps R P, Smith T J. Activation of human orbital fibroblasts through CD40 engagement results in a dramatic induction of hyaluronan synthesis and prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression. Insights into potential pathogenic mechanisms of thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 29615-29625.
- [7] Feldon S E, Park D J, O'Loughlin C W, Nguyen V T, Landskroner-Eiger S, Chang D, et al. Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 3913-3921.
- [8] 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.
- [9] Heufelder A E, Bahn R S. Elevated expression *in situ* of selectin and immunoglobulin superfamily type adhesion molecules in retroocular connective tissues from patients with Graves' ophthalmopathy[J]. *Clin Exp Immunol*, 1993, 91: 381-389.
- [10] Muller W A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24: 327-334.
- [11] Mysliwiec J, Kretowski A, Szelachowska M, Topolska J, Mikita A, Kinalska I. Serum L-selectin and ICAM-1 in patients with Graves' ophthalmopathy during treatment with corticosteroids[J]. *Immunol Lett*, 2001, 78: 123-126.
- [12] Nowak M, Wielkoszyński T, Kos-Kudła B, Marek B, Karpe J, Kajdaniuk D, et al. The blood concentration of intercellular adhesion molecule-1(sICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1(sVCAM-1) in patients with active thyroid-associated orbitopathy before and after methylprednisolone treatment[J]. *Endokrynol Pol*, 2007, 58: 487-491.
- [13] Mysliwiec J, Waligórski D, Nikolajuk 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.

[本文编辑] 贾泽军