

# TAO患者眼眶CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>成纤维细胞亚群 脂成纤维细胞转化的研究

甘露<sup>1,2</sup>, 罗清礼<sup>1</sup>, 唐飞<sup>3</sup>, 吴文文<sup>1</sup>, 唐莉<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西医院 眼科(成都 610041); 2. 中航工业三六三医院 眼科(成都 610041);  
3. 成都上锦南府医院-华西上锦分院 眼科(成都 611770)

**【摘要】** 目的 比较甲状腺相关性眼病患者(TAO)眼外肌来源和眶脂肪/结缔组织来源CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>的成纤维细胞诱导转化为脂成纤维细胞的转化率,明确对脂肪形成起主要作用的成纤维细胞亚群。方法 免疫磁分离法分离TAO患者眼眶CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>的成纤维细胞,诱导CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>成纤维细胞亚群转化为脂成纤维细胞,分别于诱导后第5、10、15、20、25 d油红O染色,计数染色阳性细胞,计算脂成纤维细胞的转化率。结果 TAO患者眼外肌来源的成纤维细胞转化为脂成纤维细胞的转化率低于眼眶脂肪/结缔组织来源的成纤维细胞( $P<0.05$ )。CD90<sup>+</sup>成纤维细胞转化为脂成纤维细胞的转化率低于CD90<sup>-</sup>成纤维细胞( $P<0.05$ )。眼外肌来源CD90<sup>+</sup>成纤维细胞基本不能转化为脂成纤维细胞。眼眶脂肪/结缔组织来源的CD90<sup>-</sup>成纤维细胞转化率最高( $P<0.05$ )。结论 眼眶成纤维细胞具有分化为脂肪细胞功能的脂成纤维细胞主要是CD90<sup>-</sup>的眶脂肪/结缔组织成纤维细胞。

**【关键词】** 甲状腺相关性眼病 眼眶成纤维细胞亚群 脂成纤维细胞

## The Study of Lipofibroblasts Differentiation of CD90<sup>+</sup> and CD90<sup>-</sup> Orbital Fibroblasts Subsets in Patients with TAO

GAN Lu<sup>1,2</sup>, LUO Qing-li<sup>1</sup>, TANG Fei<sup>3</sup>, WU Wen-wen<sup>1</sup>, TANG Li<sup>1△</sup>. 1. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Ophthalmology, AVIC 363 Hospital, Chengdu 610081, China; 3. Department of Ophthalmology, Cheng Du Shang Jin Nan Fu Hospital West China Hospital, SCU, Chengdu 611770, China

△ Corresponding author, E-mail: tangli-1a@163.com

**【Abstract】** **Objective** Divided orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) into CD90<sup>+</sup> and CD90<sup>-</sup> subsets respect to surface CD90 expression, then determined whether CD90<sup>+</sup> and/or CD90<sup>-</sup> fibroblasts were capable of differentiating into lipofibroblasts. **Methods** Fibroblasts subset separation into CD90<sup>+</sup> and CD90<sup>-</sup> subsets was accomplished by three to four rounds of magnetic bead selection, then treated with 3-isobutyl-1-l-methylxanthine (IBMX), insulin and dexamethasone which was an known inducer of the lipofibroblastic phenotype, then the cells were observed every day to find Lipid droplets. Oil red O staining were conducted at 5 d, 10 d, 15 d, 20 d and 25 d after inducing. The percent of lipofibroblasts were calculated. **Results** The ratio in fibroblast derived from extraocular muscles of differentiating into lipofibroblast is less than from connective/adipose tissue ( $P<0.05$ ). The ratio of CD90<sup>+</sup> fibroblast is less than CD90<sup>-</sup> fibroblast ( $P<0.05$ ). CD90<sup>+</sup> cells derived from extraocular muscles could not be induced to differentiate into lipofibroblast. The ratio in CD90<sup>-</sup> fibroblast from connective/adipose tissue is highest ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Orbital fibroblast which has the function of differentiating into lipofibroblast is mainly CD90<sup>-</sup> connective/adipose tissue.

**【Key words】** Thyroid-associated ophthalmopathy Orbital fibroblasts subsets Lipofibroblast

甲状腺相关眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO)是眼科常见病,主要表现为眶周水肿、眼球突出、暴露性角膜炎、复视和压迫性视神经病变等临床改变,眼眶组织的病理研究证实,TAO病变主要累及眼外肌与眼眶脂肪/结缔组织,正是眼眶脂肪增多、眼外肌纤维化、亲水性细胞外基

质的大量堆积导致了上述一系列的临床表现。眼眶成纤维细胞被认为是该病自身免疫性反应的靶细胞,成纤维细胞是一群活跃细胞,在不同组织间或同一组织间由于表型的差异以及细胞激活和分化过程的差异表现出功能上的异质性<sup>[1]</sup>。身体不同部位的成纤维细胞具有不同的生物学特性,在细胞增殖、形态、蛋白合成、分泌细胞外基质以及对多种微量调节因子(如细胞因子、激素、生长因子)调控的反应等

方面存在或多或少的差别<sup>[2-4]</sup>。研究显示,在体外,部分培养的眼眶成纤维细胞可以被诱导转化为成熟的脂肪细胞<sup>[5-6]</sup>。本研究依据培养的TAO患者眼眶成纤维细胞(脂肪/结缔组织和眼外肌)是否表达CD90,将细胞分为两个亚群,分离细胞亚群,观察比较CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>成纤维细胞诱导转化为脂肪细胞的转化率,明确对脂肪形成起主要作用的成纤维细胞亚群。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养细胞的组织来源

眼眶成纤维细胞培养组织来自我科因TAO行眼眶减压术的患者(患者均知情同意手术治疗)眼眶脂肪/结缔组织和眼外肌。排除合并其他免疫性、代谢性、感染性疾病和恶性肿瘤的患者;全身和/或局部在3个月内曾使用激素及其他任何免疫抑制剂者。

### 1.2 主要试剂和仪器

DMEM培养基、胰蛋白酶(Gibco公司,美国),新生小牛血清(成都哈里生物有限公司),CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit免疫磁珠试剂盒、DynaL MCP免疫磁分离器(DynaL公司,美国),胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、地塞米松(Sigma公司,美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 眼眶成纤维细胞的培养和免疫磁珠分离

眼眶成纤维细胞培养采用常规组织块原代培养。本实验选用培养3~7代的细胞。经3~4轮免疫磁珠分离,得到纯CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>眼眶成纤维细胞。FACS流式细胞仪间接免疫荧光染色后上机分析,鉴定分离后的细胞纯度。

**1.3.2 实验用液的配制** 诱导液:取含1 g/mL小牛血清的DMEM低糖完全培养液,加入IBMX(终浓度0.2 mmol/L)、胰岛素(终浓度10 μg/mL)、地塞米松(终浓度1 μmol/L)。维持用诱导液不加IBMX,只加胰岛素和地塞米松。油红工作液:称取油红0.7 g溶于200 mL异丙醇中室温静置过夜,滤纸过滤,收集滤液,并加入150 mL三蒸水,于4℃再次静置过夜后过滤2次,室温储存备用。

**1.3.3 脂成纤维细胞的诱导** 将对数生长期的CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>成纤维细胞消化计数后接种于预置盖玻片的6孔板,每孔1×10<sup>5</sup>个细胞,待细胞贴壁生长至基本融合后,加入诱导液。每3 d换诱导液1次。连续换液3次后撤掉IBMX,只用胰岛素

和地塞米松维持培养。

### 1.3.4 诱导出的脂成纤维细胞鉴定

**1.3.4.1 倒置相差显微镜观察** 加入诱导液后,每日常规倒置相差显微镜下观察细胞生长情况和脂肪颗粒长出情况。

**1.3.4.2 油红O法染色** 分别于诱导后第5、10、15、20、25天进行油红O法染色。取出6孔板中的盖玻片,PBS轻轻漂洗2次,体积分数为10%的甲醛固定10 min,PBS洗2次,油红O工作液浸染至少15 min,异丙醇稍稍洗去多余染液,PBS漂洗1次,苏木素复染10 min,PBS漂洗。光镜下观察,油红O染色后,脂滴被染成红色。每片子随机取10个非重叠视野(×100),计数染色阳性的细胞占总细胞数的比例,即为脂成纤维细胞的转化率。

### 1.4 统计学方法

采用*t*检验和方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

## 2 结果

### 2.1 倒置相差显微镜观察结果

诱导液对眼外肌来源的CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>成纤维细胞均有作用。加入后4~7 d,细胞由长梭形变为短圆形。眼外肌来源的CD90<sup>-</sup>成纤维细胞诱导12 d左右出现细胞成团生长,随后开始有少许细胞胞浆内出现小脂滴,1 d后,出现小脂滴的细胞数增多,3周左右出现小脂滴融合,较前略增大,但并未出现类似成熟脂肪细胞的很大的脂滴。而眼外肌来源CD90<sup>+</sup>成纤维细胞未发现脂滴。

诱导液对眼眶脂肪/结缔组织来源的CD90<sup>+</sup>和CD90<sup>-</sup>成纤维细胞均有作用。加入后3~5 d,细胞由长梭形变为短圆形。CD90<sup>-</sup>成纤维细胞诱导7 d左右出现细胞成团生长,随后开始有细胞胞浆内出现小脂滴。10 d左右,出现小脂滴的细胞数增多。18 d左右出现脂滴融合增大,部分细胞浆充满脂滴,甚至悬浮于培养液。CD90<sup>+</sup>成纤维细胞诱导10 d左右发现出现小脂滴,随时间延长,出现小脂滴的细胞逐渐增多,部分脂滴融合,较前略增大,但并未出现类似成熟脂肪细胞的大脂滴。见图1。

### 2.2 脂成纤维细胞转化率检测结果

眼外肌来源的成纤维细胞转化率低于眼眶脂肪/结缔组织来源的成纤维细胞( $P < 0.05$ )。CD90<sup>+</sup>成纤维细胞转化率低于CD90<sup>-</sup>成纤维细胞( $P < 0.05$ )。眼外肌来源CD90<sup>+</sup>成纤维细胞基本不

能转化为脂成纤维细胞。眼眶脂肪/结缔组织来源

的 CD90<sup>-</sup> 成纤维细胞转化率最高,见图 2、图 3。

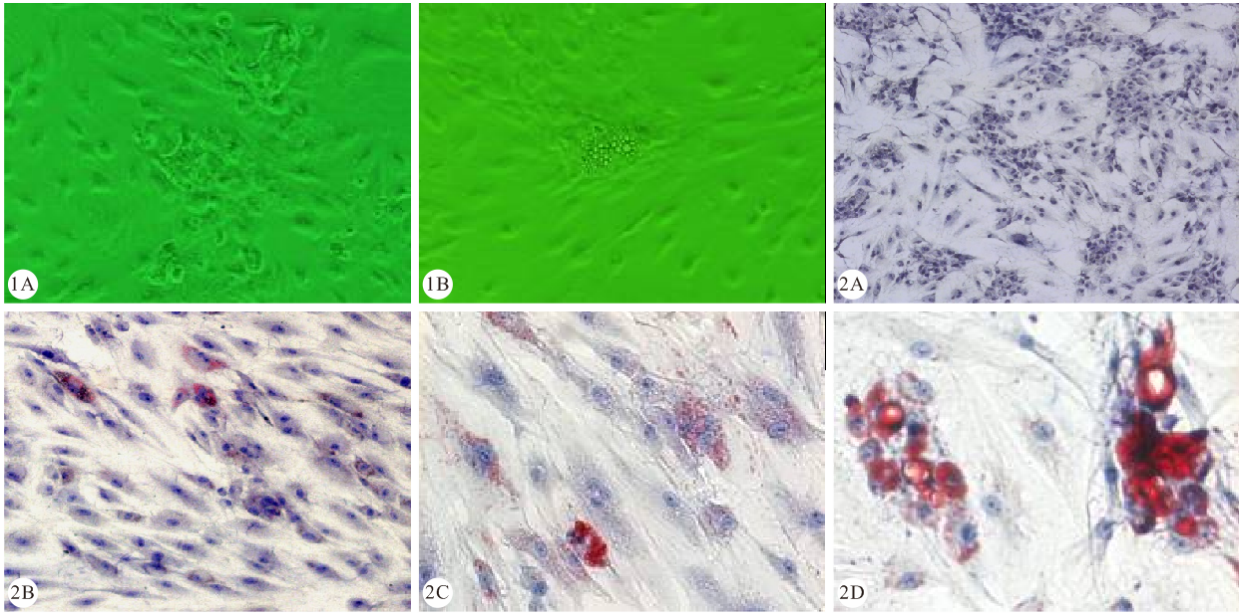


图 1 成纤维细胞的成脂诱导培养(A: 诱导培养 7 d 细胞由长梭形变为短圆形, 成团生长; B: 诱导培养 12 d, 细胞胞浆内出现的小脂滴)。相差显微镜  $\times 100$  图 2 成纤维细胞成脂诱导培养诱导 15 d。油红 O 染色  $\times 100$

Fig 1 Fibroblast induced culture (A: 7 d, cells from fusiformis to short round; B: 12 d, lipid droplets in cell plasm).  $\times 100$  Fig 2 Fibroblast induced culture 15 d. Oil red O staining  $\times 100$

2A: CD90<sup>+</sup> cells derived from extraocular muscles; 2B: CD90<sup>-</sup> cells derived from extraocular muscles; 2C: CD90<sup>+</sup> cells from adipose tissue; 2D: CD90<sup>-</sup> cells from adipose tissue

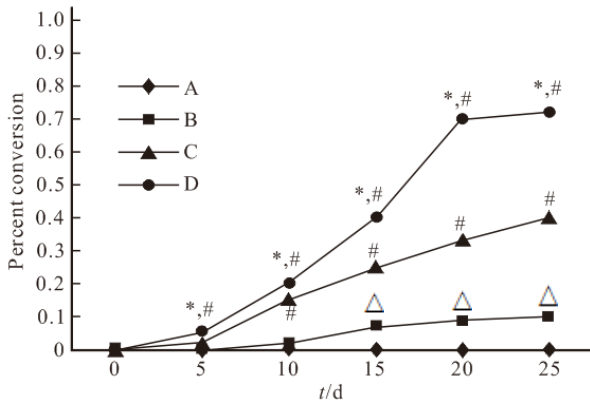


图 3 脂成纤维细胞转化率比较

Fig 3 Fibroblast percent conversion

A, B, C and D: Denote the same as fig 2. \*  $P < 0.05$ , vs. A, B and C group at the same time point; #  $P < 0.05$ , vs. A and B groups at the same time point;  $\Delta$   $P < 0.05$ , vs. A group at the same time point

### 3 讨论

87% 的 TAO 患者经 CT 证实有眼外肌和/或眼眶结缔组织、眶脂肪容积增加<sup>[7]</sup>。根据临床表现, TAO 可以分为两型<sup>[8-9]</sup>: ①眼外肌粗大、复视、视力障碍; ②眼外肌粗大不明显, 眼眶内容物容积增大, 眼球突出。突眼的程度与眼眶脂肪的容积呈正比<sup>[10]</sup>。

眼眶成纤维细胞作为 TAO 的关键效应细胞<sup>[11]</sup>, 不仅参与了眼外肌纤维化、眼眶糖胺聚糖 (GAG) 聚积, 也是眼眶脂肪的重要来源<sup>[5-6,12]</sup>。脂肪组织又可分泌许多生物活性物质来调节自身和其他组织的功能<sup>[13]</sup>。

CD90, 又叫 Thy-1 抗原, 是细胞黏附分子免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily, IgSF) 的成员, 与细胞的黏附、分化、细胞间相互作用有关, 在部分成纤维细胞表达<sup>[14]</sup>, 据此可将眼眶成纤维细胞分为两个亚群, 两群细胞功能不同<sup>[15]</sup>。鼠肺 Thy1<sup>-</sup> 成纤维细胞表达主要组织相容性复合体-II 抗原 (major histocompatibility complex, MHC-II)、分泌白介素-1 (IL-1)、激活 T 淋巴细胞, 而 Thy1<sup>+</sup> 却缺乏这些功能<sup>[16]</sup>。眼眶成纤维细胞也存在 CD90 表达异常<sup>[16]</sup>, 并且依据是否表达 CD90 抗原可分为表达 CD90<sup>+</sup> 和 CD90<sup>-</sup> 两类<sup>[17]</sup>, 成纤维细胞表型异质性可能决定了其功能异质性。

本研究结果显示, CD90<sup>+</sup> 成纤维细胞转化率明显低于 CD90<sup>-</sup> 成纤维细胞, 且不出现类似成熟脂肪细胞的大脂滴, 说明具有脂肪细胞转化潜能的成纤维细胞亚群存在于 CD90<sup>-</sup> 成纤维细胞, SMITH 等<sup>[18]</sup>的研究也证实了这一点。CD90<sup>-</sup> 成纤维细胞中仍有一部分细胞不属于脂成纤维细胞, 说明

CD90<sup>-</sup>细胞亚群内部的细胞也不是完全一样的,还有人们尚不了解的亚分类。本研究相比其他类似研究而言,区分对比了不同亚型,最终明确了具有分化为脂肪细胞功能的脂成纤维细胞主要是 CD90<sup>-</sup>的眶脂肪/结缔组织成纤维细胞,对于以后 TAO 的靶向治疗提供了依据。

眼眶脂肪/结缔组织来源的成纤维细胞较眼外肌来源的成纤维细胞更倾向于转化为脂肪细胞,这和成纤维细胞的解剖特异性相关。在体内眼眶脂肪/结缔组织和眼外肌的微环境不一样,促进脂肪转化的因素和抑制脂肪转化的因素处于动态平衡中,一些重要的促进成纤维细胞转化的因子也具有抑制脂肪形成的作用<sup>[19]</sup>。关于脂成纤维细胞的转化调控还需要进一步的深入研究。

综上所述,眼眶成纤维细胞具有解剖部位异质性,CD90<sup>+</sup>和 CD90<sup>-</sup>成纤维细胞功能不同,具有分化为脂肪细胞功能的脂成纤维细胞主要是 CD90<sup>-</sup>的眶脂肪/结缔组织成纤维细胞。

### 参 考 文 献

- [1] HEUFELDER AE. Pathogenesis of ophthalmopathy in autoimmune thyroid disease. *Rev Endocr Metab Disord*, 2000, 1(1-2):87-95.
- [2] PENNEY DP, KENG PC, DERDAK S, *et al.* Morphologic and functional characteristics of subpopulation of murine lung fibroblasts grown in vitro. *Anat Rec*, 1992, 232(3):432-443.
- [3] BERENSON CS, SMITH TJ. Human orbital fibroblasts in culture express ganglioside profiles distinct from those in dermal fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(9):2668-2674.
- [4] KURIYAN AE, WOELLER CF, O' LOUGHLIN CW, *et al.* Orbital fibroblasts from thyroid eye disease patients differ in proliferative and adipogenic responses depending on disease subtype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(12):7370-7377.
- [5] VALYASEVI RW, JYONOUCHI SC, DUTTON CM, *et al.* Effect of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and transforming growth factor-beta on adipogenesis and expression of thyrotropin receptor in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(2):903-908.
- [6] SORISKY A, PARDASANI D, GAGNON A, *et al.* Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(9):3428-3431.
- [7] FORBES G, GORMAN CA, BRENNAN MD, *et al.* Ophthalmopathy of Graves' disease: computerized volume measurements of the orbital fat and muscle. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1986, 7(4):651-656.
- [8] HIROMATSU Y, YANG D, BEDNARCZUK T, *et al.* Cytokine profiles in eye muscle tissue and orbital fat tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(3):1194-1199.
- [9] GUNJI K, DE BELLIS A, LI AW, *et al.* Cloning and characterization of the novel thyroid and eye muscle shared protein G2s: autoantibodies against G2s are closely associated with ophthalmopathy in patients with Graves' hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(4):1641-1647.
- [10] PEYSTER RG, GINSBERG F, SILBER JH, *et al.* Exophthalmos caused by excessive fat: CT volumetric analysis and differential diagnosis. *AJR Am J Roentgenol*, 1986, 146(3):459-464.
- [11] GIANOUKAKIS AG, SMITH TJ. Recent insights into the pathogenesis and management of thyroid-associated ophthalmopathy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008, 15(5):446-452.
- [12] CRISP M, STARKEY KJ, LANE C, *et al.* Adipogenesis in thyroid eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(11):3249-3255.
- [13] CAWOOD TJ, MORIARTY P, OFARRELLY C, *et al.* The effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin1 on an in vitro model of thyroid-associated ophthalmopathy, contrasting effects on adipogenesis. *Eur J Endocrinol*, 2006, 155(3):395-403.
- [14] FUKADA S, YAMAMOTO Y, SEGAWA M, *et al.* CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin alpha2 upon transplantation to dy(3k)/dy(3k) mice. *Exp Cell Res*, 2008, 314(1):193-203.
- [15] DUDAS J, MANSUROGLU T, BATUSIC D, *et al.* Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem Cell Biol*, 2009, 131(1):115-127.
- [16] KHOO TK, COENEN MJ, SCHIEFER AR, *et al.* Evidence for enhanced Thy-1 (CD90) expression in orbital fibroblasts of patients with Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*, 2008, 18(12):1291-1296.
- [17] 唐莉, 罗清礼, 夏庆杰, 等. 甲状腺相关眼病眼眶成纤维细胞 CD90 表达的研究. *四川大学学报(医学版)*, 2006, 37(6):879-881.
- [18] SMITH TJ, KOUMAS L, GAGNON A, *et al.* Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(1):385-392.
- [19] GREGOIRE FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001, 226(11):997-1002.

(2015-11-07 收稿, 2016-01-12 修回)

编辑 沈进