

# 小鼠眼眶成纤维细胞 TLR4 基因静默对甲状腺眼病的效应研究

王文英<sup>1\*</sup>, 周维明<sup>2\*</sup>, 张 意<sup>2</sup>, 陈华新<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(201203)中国上海市,上海海欣生物技术有限公司;<sup>2</sup>(200433)中国上海市,第二军医大学免疫学教研室;<sup>3</sup>(430070)中国湖北省武汉市,广州军区武汉总医院眼科  
作者简介:王文英,女,硕士,工程师,研究方向:细胞免疫治疗;  
周维明,男,助理研究员,研究方向:细胞免疫治疗。

\*:作者王文英和周维明对本文贡献一致。

通讯作者:陈华新,男,硕士,主治医师,研究方向:眼整形、眼眼病. 971213506@qq.com

收稿日期:2015-05-25 修回日期:2015-10-22

## Inhibition effect of mouse orbital fibroblasts TLR4 gene silencing on the thyroid-associated ophthalmopathy

Wen-Ying Wang<sup>1</sup>, Wei-Ming Zhou<sup>2</sup>, Yi Zhang<sup>2</sup>, Hua-Xin Chen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Haixin Biological Technology Co., Ltd, Shanghai 201203, China; <sup>2</sup>Department of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Co-first authors: Wen-Ying Wang and Wei-Ming Zhou

Correspondence to: Hua - Xin Chen. Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China. 971213506@qq.com

Received:2015-05-25 Accepted:2015-10-22

## Abstract

• AIM: To construct shRNA lentivirus interference vector of mice orbital fibroblasts TLR4 and to research the therapeutic effect and mechanism of TL4<sup>-/-</sup> fibroblasts on thyroid-associated ophthalmopathy.

• METHODS: Optimal shRNA interference expression plasmid of mouse orbital fibroblasts TLR4 gene was designed, built, and screened. Then the best shRNA was introduced into lentiviral expression vector by Gateway method and recombinant lentiviral vector was used to infect mouse orbital fibroblasts. Its capability of negative regulating the immune inflammatory response was researched. At last the method of fibroblast TLR4 gene silencing in the model mice of thyroid - associated ophthalmopathy was used, the *in vivo* therapeutic effect was observed.

• RESULTS: ShRNA sequences with the best effect of

gene silencing were selected and introduced into lentiviral vectors (virus titer was  $1.5 \times 10^6$  TU/mL). Balb/c mice orbital fibroblasts transfected lentivirus could negatively regulate the immune response, inhibit immune inflammatory response. The proceeding of thyroid - associated ophthalmopathy of the mice transfected TLR4<sup>-/-</sup> recombinant lentivirus was obviously prior to that of the control mice.

• CONCLUSION: Mouse fibroblast TLR4<sup>-/-</sup> siRNA lentiviral vectors are successfully obtained, which has the favourable inhibitory effect on immune inflammatory responses. The recombinant lentivirus could protect the proceeding of thyroid - associated ophthalmopathy, therefore the TLR4 expression interference is a novel potential target for thyroid-associated ophthalmopathy.

• KEYWORDS: shRNA; TLR4; fibroblast; thyroid - associated ophthalmopathy; negative regulation to immune responses

**Citation:** Wang WY, Zhou WM, Zhang Y, *et al.* Inhibition effect of mouse orbital fibroblasts TLR4 gene silencing on the thyroid-associated ophthalmopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015; 15(11):1862-1866

## 摘要

目的:构建小鼠眼眶成纤维细胞 TLR4 的 shRNA 慢病毒干扰载体,研究 TL4<sup>-/-</sup> 的成纤维细胞对甲状腺相关性眼病的治疗作用和机制。

方法:设计、构建、筛选小鼠眼眶成纤维细胞 TLR4 基因的最优干扰 shRNA 表达质粒,选择 Gateway 方法将质粒导入慢病毒表达载体中,使用重组慢病毒载体感染小鼠眼眶成纤维细胞,研究其对免疫炎症反应的负向调控能力,并在小鼠甲状腺眼病模型中采用沉默成纤维细胞 TLR4 基因的方法,观察其体内治疗效果。

结果:筛选出具有最好基因静默效果的 shRNA 序列,导入慢病毒载体,病毒滴度为  $1.5 \times 10^6$  TU/mL。转染慢病毒的 Balb/c 小鼠眼眶成纤维细胞能够负向调控免疫应答,抑制免疫炎症反应。在疾病动物模型中转染了干扰病毒载体实验组小鼠,其眼病发生发展情况均优于对照组。

结论:成功获得了小鼠成纤维细胞 TLR4<sup>-/-</sup> shRNA 的慢病毒载体,转染了该载体的小鼠眼眶成纤维细胞能够抑制正向免疫应答,可以有效地抑制甲状腺眼病的发展,揭示干扰 TLR4 表达可能成为防治甲状腺眼病的生物诊疗措施。

关键词:shRNA; toll 样受体 4; 成纤维细胞; 甲状腺相关眼病; 负向免疫调节

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.11.06

引用:王文英,周维明,张意,等.小鼠眼眶成纤维细胞 TLR4 基因静默对甲状腺眼病的效应研究.国际眼科杂志 2015;15(11):1862-1866

## 0 引言

甲状腺相关性眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是当前我国发病率最高的眼眶组织疾病之一,除眼部病变外,还伴有甲状腺损伤与功能紊乱情况。TAO 的病程分为活动期和非活动期(静止期),其眼部临床表现为眼泪、眼球运动障碍、眼睑改变、视神经受损。因为 TAO 发病机制复杂,所以目前缺乏对其有效的诊疗措施<sup>[1-2]</sup>。新近的研究发现,TAO 是一种自身免疫疾病,是机体免疫系统在甲状腺疾病所释放的甲状腺球蛋白等自身抗原的刺激下产生自身抗体,继而激活眼眶成纤维细胞,使成纤维细胞释放出 T 细胞趋化因子,最终使眼眶的免疫细胞相互作用并活化,产生自身免疫反应,导致眼眶组织广泛的结构改变和炎症损伤<sup>[3-5]</sup>。

成纤维细胞(Fibroblasts)是一种生长与裂殖迅速的细胞种群,是疏松结缔组织的主要组成来源,被细菌脂多糖等细菌产物和细胞因子激活后可分泌新的细胞因子,趋引免疫细胞参与机体的免疫应答<sup>[6-7]</sup>。研究表明,眼眶成纤维细胞(orbital fibroblast, OF)表面高表达的 CD40 与 T 细胞表面的 CD40L(CD154)识别、结合提供 T 细胞的共刺激信号通路,导致 T 细胞的充分活化,促进炎症因子的分泌表达<sup>[8-9]</sup>。有研究指出成纤维细胞中促发炎症反应的主要信号分子是 TLR4<sup>[10]</sup>,为此我们研究静默眼眶成纤维细胞的 TLR4 基因表达对 TAO 的治疗效应。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 293 细胞株购自 ATCC。小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$  的 ELISA 试剂盒购自 Sigma 公司。miRNA 表达载体 pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFPmiR、慢病毒质粒 pLenti6.3/V5-DEST、包装病毒系统 ViraPower<sup>TM</sup> Packaging Mix 均购自 Invitrogen 公司。TLR4 一抗(兔抗大鼠)、 $\beta$ -actin 一抗(小鼠抗大鼠)、羊抗兔、羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司。DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司。6~8 周龄的 SPF 级 Balb/c 小鼠购自上海杰思捷公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 设计构建 TLR4 siRNA 干扰质粒** 利用 RT-PCR 方法从小鼠眼眶成纤维细胞中克隆 TLR4 的基因序列,将基因序列导入到真核载体 pEGFP-N1 中,构建真核表达载体 pEGFP-N1-TLR4。使用在线 RNA 设计软件 ihome 设计 4 种可能具有 TLR4 基因干扰效力的序列, Bam H I 和 Hind III 双酶切目的基因片段和表达载体 pcDNATM 6.2-GW/EmGFPmiR,以 T4DNA 连接酶连接载体和目的基因,构建眼眶成纤维细胞 TLR4 shRNA 重组干扰质粒。

**1.2.2 最优干扰 RNA 的筛选** 将得到的 4 段干扰序列分别命名为 sht001, sht002, sht003, sht004(阴性对照序列为 sht NC),将各质粒分别与 TLR4 真核表达载体共转染进入 293 细胞,48h 后收集细胞,抽提胞内蛋白质行蛋白质免疫印记检测,筛选最佳干扰效率的 RNA。

**1.2.3 慢病毒干扰载体的构建和病毒包装测定** 将获得的 4 段序列中具有最高干扰效率的 sht001 序列用 Gateway 技术重组到慢病毒表达载体 pLenti6.3 中,命名为 pLenti6.3-sht001,经测序验证正确后进行病毒包装,



图1 pEGFP-N1-TLR4 真核表达质粒的鉴定 1:pEGFP-N1-TLR4;2:Untransfected。

将 ViraPower<sup>TM</sup> Packaging Mix 和慢病毒表达载体转染入 293 细胞,48h 后收集细胞上清,包装出的病毒命名为 Lv-sht001,病毒滴度测定采用倍比稀释法感染 293 细胞法检测。

**1.2.4 小鼠眼眶成纤维细胞的获取** 处死 Balb/c 小鼠,无菌摘取眼眶组织,剪碎呈 1mm<sup>3</sup>大小,利用 II 型蛋白酶加胰蛋白酶联合消化法分离细胞,在通过差速贴壁分离法收集培养小鼠眼眶成纤维细胞。

**1.2.5 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测 TLR4 沉默的 OF 刺激同种异体 T 细胞增殖反应** 将分离的 OF 分为 4 组并于 24 孔细胞培养板中培养,1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL,每孔 1mL,分 4 组,分别为:(1)非刺激 OF 组(未转染载体);(2)空载体转染 OF 组(转染空载体 Lv-shtNC);(3)sht 刺激 OF 组(转染 Lv-sht001);(4)LPS 刺激 OF 组(未转染 sht+200ng LPS 刺激)。分别转染刺激,培养 24h 后加入同种异体的 CD4<sup>+</sup>T 细胞继续培养 48h,加入 <sup>3</sup>H,液闪计数器检测各组反应生物 cpm 值。收集各组的细胞培养上清,ELISA 法检测其中 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$  的表达水平。

**1.2.6 制备小鼠甲状腺眼病模型和研究重组慢病毒 Lv-sht001 对小鼠眼眶纤维化进程的抑制效应** 参照文献方法<sup>[11]</sup>建立实验动物模型,取 40 只 Balb/c 雌性小鼠,分 2 组,每组 20 只。以重组质粒 pcDNA3.1-TSHR 多部位注射每只小鼠方法建立小鼠甲状腺眼病模型。接下来将疾病小鼠分为生理盐水组和 Lv-sht001 重组病毒组 2 组,每组 20 只:生理盐水组,眼眶局部内注射 0.5mL 生理盐水;Lv-sht001 重组病毒组,采用眼眶内基因枪注入 Lv-sht001 的重组病毒 4 $\times$ 10<sup>8</sup>TU。分别于第 7、14、21、28d 处死动物,每次每组处死 5 只,磁珠分选出眼眶中的 CD4<sup>+</sup>T 细胞,培养 4h 后收集培养上清,使用悬浮芯片系统测定其中 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$  的表达含量。

统计学分析:采用 SPSS 12.0 统计软件分析处理,组间比较选择 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 构建 pEGFP-N1-TLR4 表达质粒和筛选最高干扰效率的 shRNA** 采用 TLR4 真核基因表达载体 pEGFP-N1-TLR4,转染 293 细胞 48h 后,裂解细胞行蛋白质免疫印迹检测可见胞内有 TLR4 表达(图 1)。依据软件设计的 4 段 shRNA 序列(表 1),携带干扰 shRNA 的载体转染 293 细胞 48h 后,行 TLR4 蛋白质印记检测(图 2),并采用 Quantity One 4.0 软件分析各蛋白表达条带灰度,各条 shRNA 的抑制效率分别为 sht001(86.8 $\pm$ 4.8)%, sht002(15.9 $\pm$ 1.9)%, sht003(75.1 $\pm$ 6.3)%, sht004(78.1 $\pm$ 5.9)%, shtNC(6.8% $\pm$ 1.5)%,可见其中 sht001 抑制 TLR4 效果最佳。

**2.2 慢病毒抑制载体的包装和病毒滴度测定** 用筛选出

表1 设计的 shRNA 序列

名称	序列(5'-3')
sh001	TGCTGTACAGTGGCTGCCACTAGCACGTTTTCGCCAGGGACTGACGTGCTTGTAGCTACTGTA CCTGTACAGTGGGTAACAAGCGCGTCACTGACTGGCCCAAACGTGCTGGTTGGAGCCACTGTAC
sh002	TGCTGATAACGTTCCGACTCTTGTGGGGCTTGGCGACTGACTGACCCACAAGACCCAAAAGTTAT CCTGATAACTTTCGGTCTTGTGGGTCACGCAGCTGCCTAAAACGCACAAGAGGCGGATAATTATC
sh003	TGCTGTGATCAAGCCATGAAATATTCGTAATGGCCACTGTCTGACGCAGTCTTGGCTTGATCA CCTGTGATCAAGCGAAAATATATGTCAGTTAGTGGCCAAAAGTGCATTTCTTGGCTTGATCAC
sh004	TGCTGTTCAAAGAGTAACCAGCGGGTGTTTTGGCCACTGACTGAGAGCCGTTGGTATCTTTGAA CCTGTTCAAAGTCCCAACGCGTGTCTGTCCCTGGCCAAAACAGCGGTTGGTGTATCTTTGAAAC
shNC	TTTCTCCGAACGTGTCACGTTTGAAGATGACGGCACACGTTCCGAGAATTTTTTCGCCTGGTAC TCGAGAAAAAATTTCTCCGACCCTGTCACGTTCTTAGGAAACCTGACACGTTCCGAGAAATTCGA

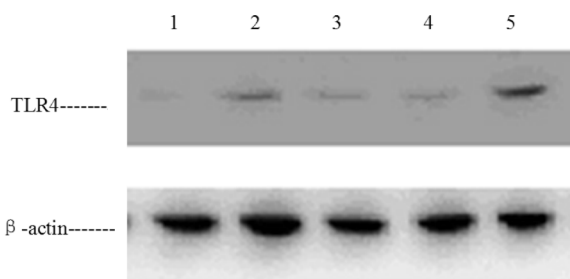


图2 蛋白质免疫印迹法检测筛选最优干扰效率的 shRNA 1: sh001; 2: sh002; 3: sh003; 4: sh004; 5: shNC。

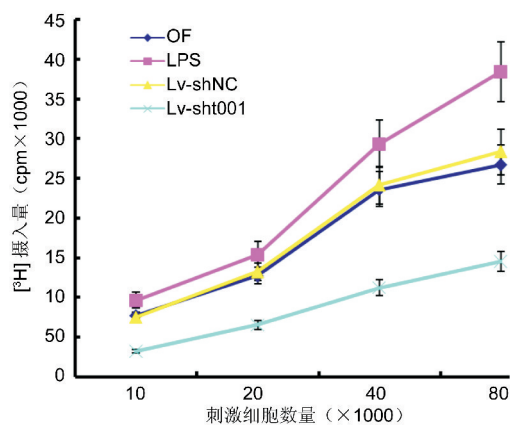


图3 各组 OF 刺激的同种异基因 T 细胞增殖。

的抑制效率最佳的 sh001 序列导入慢病毒载体,包装后,得到的病毒滴定为  $1.5 \times 10^6$  TU/mL。

### 2.3 感染重组慢病毒 Lv-sh001 的 OF 抑制 MLR 反应

我们将 Balb/c 小鼠来源的眼眶成纤维细胞分为未刺激 OF 组,空载体刺激 OF 组,sh 刺激 OF 组和 LPS 刺激 OF 组等 4 组,分别加入 C57 小鼠的同种异基因脾脏 T 细胞,行  $^3\text{H}$  摄入检测 MLR。如图 3 所示,结果表明:与未刺激 OF 组相比,Lvsh001 转染组可以显著抑制 MLR 反应( $P < 0.05$ ),而空载体刺激组和未刺激 OF 组相比,无统计学差异( $P = 0.205$ ),均能促进 MLR 反应发生。

### 2.4 感染过 Lv-sh001 的重组慢病毒修饰的 OF 对 MLR 反应中细胞因子表达的影响

Lv-sh001 重组慢病毒感染的 OF 诱导的 MLR 反应中,如图 4 所示,细胞上清内 Th1 亚群的细胞因子 TNF- $\alpha$  (图 4A)、IL-2 (图 4B)、IFN- $\gamma$  (图 4C) 的含量都比未刺激 OF 组和空载体组 Lv-shNC 明显降低( $P < 0.05$ )。

### 2.5 TLR4 沉默后小鼠甲状腺眼病模型中 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌炎性细胞因子的变化

按常规方法建立 TAO 感染小鼠动物模型,导入 TLR4 干扰慢病毒 Lv-sh001,分别于 4 个时间点处死小鼠,收集、磁珠分选眼眶部位内的 CD4<sup>+</sup>T 细胞,培养 4h 后,采用 Bio-Plex 悬浮芯片系统测定胞内 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$  的含量,发现 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$  含量显著下降( $P < 0.05$ ,表 2)。

### 3 讨论

格雷夫斯病 (Graves disease, GD) 是机体针对促甲状腺激素受体 (thyrotropin receptor, TSHR) 产生循环抗体,触发甲状腺功能亢进而导致出现甲状腺毒症的一种自身免疫疾病<sup>[12-13]</sup>,GD 在临床上的常见表现为甲状腺的肿大、毒症、炎症病变,眼眶组织的重塑或者出现其他一些罕见皮肤病<sup>[14-15]</sup>。若 GD 侵入眼眶,所引起的眼部病变即称为甲状腺相关性眼病 (TAO)。TAO 的病程可分为活动期与非活动的静止期,活动期的病理特征是眼眶内和眼眶周围脂肪和结缔组织的广泛炎症,眼外肌肌纤维和眼眶脂肪之间大量的 T 淋巴细胞、肥大细胞浸润,以及偶尔出现的 B 细胞。活动期中眼眶组织中的单核细胞、巨噬细胞和成纤维细胞等合成的促炎性细胞因子在诱发自身炎症反应以及形成细胞外基质的进程中发挥了重要的作用;眼眶间质中沉积的透明质酸的性质与数量不仅决定 TAO 的病变组织学特征,还影响着眼眶组织的膨胀损伤程度。稳定静止期的 TAO 通常表现为炎症反应减弱消退,并伴有临床症状的改善。TAO 的活动期以分泌 Th1 类细胞因子为主,而静止期则主要分泌 Th2 类细胞因子。TAO 在炎症反应过程中早期出现大量活化的 T 细胞浸润眼眶,其产生的细胞因子和趋化因子反馈作用于 T 细胞,从而放大免疫炎症效应,造成强烈组织损伤,因而有学者指出控制 TAO 疾病过程中 T 细胞介导的炎症应答可以成为 TAO 生物治疗的关键手段<sup>[16-18]</sup>。

成纤维细胞,过去认为仅是局部微环境中的组织结构成分,作用是合成细胞外基质成分并维持组织的动态平衡。但新近研究发现,成纤维细胞还是一种能与特定免疫细胞之间进行信号传递通讯的细胞。成纤维细胞能通过增殖、分化为免疫效应细胞来合成细胞因子、趋化因子和脂质中间体等成分参与炎症的活化通路<sup>[19-20]</sup>。眼眶成纤维细胞 (OF) 特别是来源于 TAO 患者的 OF,在与细胞因子反应时具有独特性,OF 与 IL-1 $\beta$ 、CD40L 作用时,可产



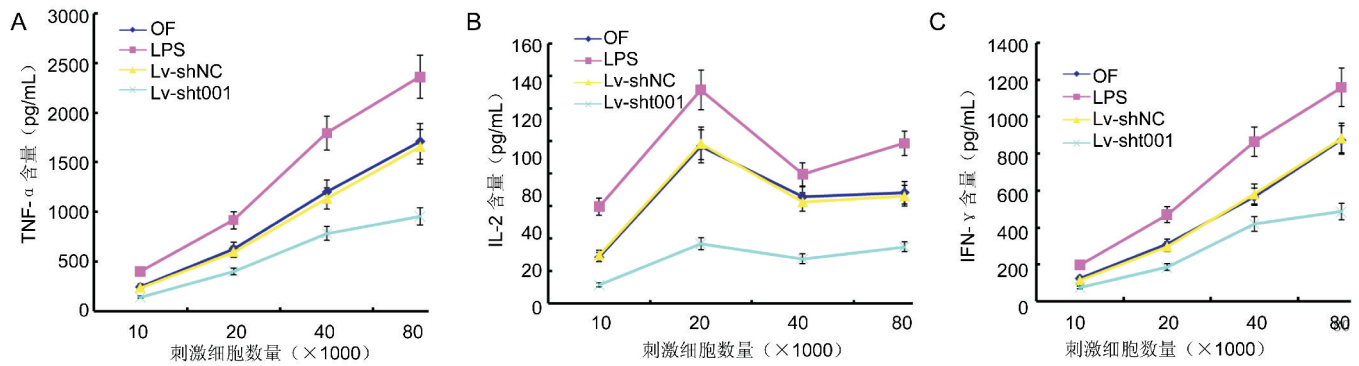


图4 各组 OF 诱导的 MLR 反应体系上清中 Th1 型细胞因子表达水平 A:各组 OF 诱导的 MLR 反应体系上清中 TNF- $\alpha$  细胞因子表达水平;B:各组 OF 诱导的 MLR 反应体系上清中 IL-2 细胞因子表达水平;C:各组 OF 诱导的 MLR 反应体系上清中 IFN- $\gamma$  细胞因子表达水平。

表2 各时间点甲状腺眼病模型中小鼠眼眶 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌炎症细胞因子情况 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL, n=3)

分组	时间点	TNF- $\alpha$	IL-2	IFN- $\gamma$
生理盐水组	7d	125.26 $\pm$ 13.16	7.58 $\pm$ 3.04	16.54 $\pm$ 3.01
	14d	158.62 $\pm$ 17.51	6.56 $\pm$ 2.97	25.48 $\pm$ 2.92
	21d	132.23 $\pm$ 14.21	8.01 $\pm$ 1.98	21.06 $\pm$ 1.92
	28d	109.13 $\pm$ 10.05	4.72 $\pm$ 1.52	18.97 $\pm$ 1.42
Lv-sht001 重组病毒组	7d	45.37 $\pm$ 9.63 <sup>a</sup>	6.02 $\pm$ 5.10 <sup>a</sup>	7.09 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>
	14d	68.12 $\pm$ 14.62 <sup>a</sup>	5.34 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>	10.41 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>
	21d	57.41 $\pm$ 12.11 <sup>a</sup>	4.72 $\pm$ 3.09 <sup>a</sup>	9.71 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>
	28d	50.54 $\pm$ 13.59 <sup>a</sup>	3.21 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	7.62 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 生理盐水组同时间段。

生过量的前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), 并能促进合成细胞外基质透明质酸<sup>[21-22]</sup>。T 细胞通过膜表面的 CD40L 与 OF 表面的 CD40 作用从而在 OF 的活化中发挥重要作用, 一旦 CD40 与 T 细胞表面的 CD40L 结合, 诱发幼稚 T 细胞的大量增殖, 提高促炎细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8 等的产生, 这些因子会导致透明质酸合成酶以及葡萄糖脱氢酶的表达升高, 增强炎症反应。受刺激的 OF 分泌的多种细胞因子中含有 IL-16 与趋化因子 rantes, 可以趋引 T 细胞迁徙<sup>[23-24]</sup>。因而有效阻断 OF 的活化或是阻止 OF 于 T 细胞之间的相互信号作用通路对于相关疾病的治疗是一个关键。

TLR4 是 OF 表面的一种重要膜表面受体, 其可以识别细菌脂多糖后被活化, 激活的 TLR4 经过胞内一系列下游信号启动细胞因子, 从而诱发一系列的免疫反应并导致急性慢性炎症<sup>[25]</sup>, 而在炎症演变的进程中, 炎症导致眼眶组织病变。因而阻断或抑制 TLR4 信号传递有望成为探索 TAO 的发病机制和生物干预治疗的一种手段。

短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 对干扰基因表达具有高效性和特异性, 在科研实践中已被用于干扰基因表达的有效载体<sup>[26]</sup>。在本实验中, 依据设计软件设计可能的 TLR4 shRNA 干扰序列片段, 筛选得到最佳干扰 TLR4 基因表达的 shRNA 序列, 克隆入慢病毒系统, 导入细胞内实现胞内 TLR4 基因的特异性静默。慢病毒的转染效率较高且安全性较好, 当前已经成为科研中病毒转染的首选载体<sup>[27]</sup>。我们从小鼠 OF 的 TLR4 序列中筛选了有效干扰靶点序列, 并成功构建重组慢病毒转染 OF, 有效抑制了其胞内 TLR4 的表达, 体外结果显示了 LV-sht001

能有效抑制 OF 中 TLR4 基因的表达, 其转染的 OF 能有效抑制 MLR 反应中 T 细胞的增殖, 并且降低 T 细胞相关炎症细胞因子分泌水平。体内小鼠动物实验也证实, 导入干扰 TLR4 基因慢病毒实验组小鼠, 其眼眶内 T 细胞分泌的细胞因子水平显著下降。这些结果显示经 shRNA 沉默的 TLR4 在抑制 TAO 的发展中可能起重要作用, 有望成为治疗 TAO 的新型生物靶点。但由于 TAO 的发生发展机制非常复杂, 对于探索经 TLR4 干扰 OF, 调控眼眶内细胞炎症反应进程的效应和作用机制仍需要深入探索和研究。

#### 参考文献

- 1 Fatourech V. Medical management of extrathyroidal manifestation of graves disease. *Endocr Pract* 2014;20(12):1333-1344
- 2 Lim HS, Back KO, Kim HJ, et al. Hyaluronic Acid Induces COX-2 Expression via CD44 in Orbital Fibroblasts From Patients With Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(11):7441-7450
- 3 Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, et al. Extra-ocular muscle cells from patients with Graves' ophthalmopathy secrete  $\alpha$  (CXCL10) and  $\beta$  (CCL2) chemokines under the influence of cytokines that are modulated by PPAR $\gamma$ . *Autoimmun Rev* 2014;13(11):1160-1166
- 4 Kan E, Kan EK, Ecemis G, et al. Presence of thyroid-associated ophthalmopathy in Hashimoto's thyroiditis. *Int J Ophthalmol* 2014;7(4):644-647
- 5 Salvi M. Immunotherapy for Graves' ophthalmopathy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014;21(5):409-414
- 6 Wu X, Zhang G, Wang X, et al. Endotoxin tolerance induction in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with different bacterial lipopolysaccharides. *Arch Oral Biol* 2014;60(3):463-470
- 7 Ren A, Moon C, Zhang W, et al. Asymmetrical Macromolecular Complex Formation of Lysophosphatidic Acid Receptor 2 (LPA2)

Mediates Gradient Sensing in Fibroblasts. *J Biol Chem* 2014;289(52):35757-35769

8 Chng CL, Lai OF, Chew CS, et al. Hypoxia increases adipogenesis and affects adipocytokine production in orbital fibroblasts - a possible explanation of the link between smoking and Graves' ophthalmopathy. *Int J Ophthalmol* 2014;7(3):403-407

9 Martins TM, de Paula AC, Gomes DA, et al. Alkaline phosphatase expression/activity and multilineage differentiation potential are the difference between fibroblasts and orbital fat-derived stem cells--a study in animal serum-free culture conditions. *Stem Cell Rev* 2014;10(5):697-711

10 Shan SJ, Douglas RS. The pathophysiology of thyroid eye disease. *J Neuroophthalmol* 2014;34(2):177-185

11 Costagliola S, Many MC, Deneff JF, et al. Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. *J Clin Invest* 2000;105(6):803-811

12 Javadi H, Pashazadeh AM, Mogharrabi M, et al. Comparison of Thyroid Blood Flow and Uptake Indices Using Technetium - 99m Pertechnetate in Patients with Graves' Disease and Euthyroid Subjects. *Mol Imaging Radionucl Ther* 2014;23(3):96-100

13 Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, et al. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev* 2014;14(2):174-180

14 Samuelsson K, Palmer M, Press R. Sensory ataxia associated with Graves' disease. *J Neurol Sci* 2014;347(1-2):406-407

15 Yin J, Zhu J, Huang D, et al. Unilateral Symptomatic Intracranial Arterial Stenosis and Myopathy in an Adolescent with Graves Disease: A Case Report of an High-resolution Magnetic Resonance Imaging Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015;24(1):e49-52

16 Fatourechi V. Thyroid dermopathy and acropachy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26(4):553-565

17 Ardley M, McCorquodale T, Laahooti H, et al. Eye findings and immunological markers in probands and their euthyroid relatives from a

single family with multiple cases of thyroid autoimmunity. *Thyroid Res* 2012;5(1):4

18 Bartalena L. Prevention of Graves' ophthalmopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26(3):371-379

19 Riemann A, Ihling A, Thomas J, et al. Acidic environment activates nflammatory programs in fibroblasts via a cAMP - MAPK pathway. *Biochim Biophys Acta* 2014;1853(2):299-307

20 Cölz L, Bayer S, Keilig L, et al. Possible implications of Ni(II) on oral IL-1 $\beta$ -induced inflammatory processes. *Dent Mater* 2014;30(12):1325-1335

21 Rhiu S, Chae MK, Lee EJ, et al. Effect of tanshinone IIA in an in vitro model of Graves' orbitopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(9):5900-5910

22 Virakul S, Dalm VA, Paridaens D, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib effectively blocks PDGF-induced orbital fibroblast activation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;252(7):1101-1109

23 Lee SH, Lim SY, Choi JH, et al. Benzylideneacetophenone derivatives attenuate IFN- $\gamma$ -induced IP-10/CXCL10 production in orbital fibroblasts of patients with thyroid-associated ophthalmopathy through STAT-1 inhibition. *Exp Mol Med* 2014;46:e100

24 Lee WM, Paik JS, Cho WK, et al. Rapamycin enhances TNF- $\alpha$ -induced secretion of IL-6 and IL-8 through suppressing PDCD4 degradation in orbital fibroblasts. *Curr Eye Res* 2013;38(6):699-706

25 Pone EJ, Lou Z, Lam T, et al. B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination; Modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses. *Autoimmunity* 2015;48(1):1-12

26 Moffat J, Sabatini DM. Building mammalian signaling pathways with RNAi screens. *Nat Rev Mol Biol* 2006;7(1):177-187

27 Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods* 2006;3(9):682-688