

TAO 患者眼眶脂肪组织中脂肪特异性磷脂酶 A2 mRNA 表达水平分析

朱昭亮, 陈 涛, 田冰玉, 张 华

作者单位: (710004) 中国陕西省西安市第四医院眼科
作者简介: 朱昭亮, 毕业于西安交通大学医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼眶疾病、眼部整形。
通讯作者: 陈涛, 毕业于西安交通大学医学院, 学士, 主治医师, 研究方向: 眼外伤、眼眶疾病. 2149045131@qq.com
收稿日期: 2018-02-10 修回日期: 2018-06-01

Differential expression of adipose-specific phospholipase A2 mRNA in orbital adipose tissue in patients with TAO

Zhao - Liang Zhu, Tao Chen, Bing - Yu Tian, Hua Zhang

Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Tao Chen. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. 2149045131@qq.com

Received: 2018-02-10 Accepted: 2018-06-01

Abstract

• **AIM:** To analyze the difference in the level of fat-specific phospholipase A2 (AdPLA) mRNA in the orbital adipose tissue between patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) and normal subjects.

• **METHODS:** Thirty-seven patients (37 eyes) with TAO (stationary stage III) who underwent orbital decompression surgery in our hospital from December 2016 to December 2017 were selected as the observation group; in the same period, 35 cases (35 eyes) of normal orbital adipose tissue were selected as the control group, which the source of the normal eyelid tissue was cosmetic surgery, pouch resection and ptosis correction. The eyeball protrusion was used to measure the degree of protrusion of the eye on the fat side of the observation group and the control group, and the BMI status of the two groups was calculated. A 16-slice spiral CT from Siemens motion was used to perform CT examination of the eyelids of both groups of subjects. Image J was used to detect the fat volume of the fat side and real time PCR was used to detect the expression of AdPLA mRNA in the adipose tissue of the eyelids.

• **RESULTS:** There was no significant difference in mean age, BMI, and gender between the observation group and the control group ($P > 0.05$); the intraocular fatty acid

content, ocular outgrowth and intracellular AdPLA mRNA expression in the observation group were 32.21 ± 1.85 mL, 19.97 ± 1.56 mm, and 0.04 ± 0.01 , higher than those in the control group 24.05 ± 1.64 mL, 14.07 ± 1.48 mm, 0.01 ± 0.003 , respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The intraocular fatty acid content, ocular outgrowth and intracellular expression of AdPLA mRNA in TAO patients are all higher than those in normal subjects. The increase of AdPLA expression in the adipose tissue of eyes of TAO patients resulted in a decrease in the amount of fat hydrolysis and an increase in fat accumulation and increased emphasis.

• **KEYWORDS:** thyroid associated ophthalmopathy; lipid hydrolysis; ocular protrusion; fatty-specific phospholipase A2

Citation: Zhu ZL, Chen T, Tian BY, *et al.* Differential expression of adipose-specific phospholipase A2 mRNA in orbital adipose tissue in patients with TAO. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018; 18 (7):1333-1335

摘要

目的: 分析甲状腺相关眼病(TAO)患者与正常人眼眶脂肪组织中脂肪特异性磷脂酶 A2(AdPLA)mRNA 表达水平差异性。

方法: 选取 2016-12/2017-12 在本院进行眼眶减压手术的 37 例 TAO(静止期 III 级)患者作为观察组,选取同期正常眼眶脂肪组织 35 例 35 眼为对照组,其来源为美容、眼袋切除手术和上睑下垂矫正手术者;使用眼球突出计检测观察组与对照组选取脂肪一侧眼球突出度,并计算两组对象 BMI 状况,使用西门子 emotion16 排螺旋 CT 对两组对象眼眶行 CT 检测,使用 Image J 检测选取脂肪一侧眼部脂肪体积状况,Real time PCR 法检测眼眶脂肪组织内 AdPLA mRNA 表达状况。

结果: 观察组与对照组平均年龄、BMI 及性别对比差异均无统计学意义($P > 0.05$);观察组患眼内脂肪含量、眼球突出度及组织内 AdPLA mRNA 表达量分别为 32.21 ± 1.85 mL、 19.97 ± 1.56 mm、 0.04 ± 0.01 高于对照组的 24.05 ± 1.64 mL、 14.07 ± 1.48 mm、 0.01 ± 0.003 , 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: TAO 患者眼内脂肪含量、眼球突出度及组织内 AdPLA mRNA 表达量均比正常人高,TAO 患者眼部脂肪组织内 AdPLA 表达量升高造成了其脂肪水解量降低,脂肪堆积量增大使其眼球突出程度加重。

关键词: 甲状腺相关眼病; 脂肪水解; 眼球突出; 脂肪特异性磷脂酶 A2

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.7.41

引用: 朱昭亮, 陈涛, 田冰玉, 等. TAO 患者眼眶脂肪组织中脂肪特异性磷脂酶 A2 mRNA 表达水平分析. 国际眼科杂志 2018; 18(7): 1333-1335

0 引言

甲状腺相关眼病 (Thyroid associated ophthalmopathy, TAO) 是临床较为常见眼科疾病, 为成年人中和甲状腺类疾病有紧密联系的自身免疫性眼病, 其临床特征是压迫性视神经病变、眼球突出、暴露性角膜炎、眼睑退缩迟落、限制性眼外肌病变和眶周肿胀等^[1-2]。临床患者眼球突出多是由于糖胺多糖沉积、眼眶脂肪增大、眼外肌的内炎性细胞及眼眶脂肪结缔组织浸润等, 而 TAO 患者中 50% 以上其眼球突出是眼眶脂肪增大而引发的。脂肪细胞体积变大、脂肪细胞数量增多为引起 TAO 患者眼眶脂肪变多主要因素, 脂肪细胞中水解降低与形成脂肪变多都会造成脂肪细胞体积变大^[3-4]。TAO 患者的眼眶脂肪细胞生成加速已得到证实, 但关于细胞水解方面的研究较少。脂肪特异性磷脂酶 A2 (adipose specific phospholipase A2, AdPLA) 为眼眶脂肪内主要水解调控因子^[5], 因此, 本文通过分析正常人和 TAO 患者眼眶脂肪内 AdPLA mRNA 表达水平差异, 为临床患者治疗提供一些实验室依据。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2016-12/2017-12 间在本院进行眼眶减压手术的 37 例 37 眼 TAO (静止期 III 级) 患者作为观察组, 年龄 22~52 岁, 男 19 例, 女 18 例; 选取同期正常眼眶脂肪组织 35 例 35 眼为对照组, 其来源为美容、眼袋切除手术和上睑下垂矫正手术者, 年龄 19~58 岁, 男 20 例, 女 15 例。

1.1.1 TAO 诊断准则 诊断准则: (1) 上睑退缩, 同时合并压迫性视神经病变或眼球突出或眼外肌受累或甲状腺功能异常; (2) 若患者上睑没有退缩, 则特征是甲状腺异常同时合并压迫性视神经病变或眼球突出或眼外肌受累。

1.1.2 纳入及排除条件 TAO 患者纳入条件: (1) 年龄 18~60 岁; (2) 活动性程度 (CAS) 得分保持 0 或者 1 分在 1a 以上; (3) BMI 指数 18.50~24.99; (4) 停止使用糖皮质激素 1a 以上或者从来没有使用过; (5) 机体甲状腺功能控制正常在 1a 以上者; (6) 眼眶 CT 为双侧或者单侧眼球突出, 眼眶内脂肪变多; (7) 患眼的眼球突出比对侧眼高于 2mm 及以上, 或者两眼的突出度高于 18mm 及以上。排除条件: (1) 合并高血压、高度近视、高脂血症、全部或者眼部肿瘤及糖尿病等; (2) 发生暴露性角膜炎或者压迫性视神经病变进行眼眶减压手术者; (3) 合并全身或者眼部免疫性疾病者; (4) CAS 得分在 2 分以上或者近 1a 内仍在使用糖皮质激素者。

1.2 方法 (1) 使用 RNA 的试剂盒对样本 RNA 进行抽提。将 RNA 提取剂加入到脂肪样品内, 摇匀, 移到离心管内, 放置 5min。离心机 10000r/min 离心 5min 后取上清液, 将氯仿加入上清液内, 混合至乳白色。放置 5min 后离心机 10000r/min 离心 15min 后取出离心管, 看到浆液分成了 3 部分 (有机相、白色蛋白层和上清液)。上清液移

至新离心管内, 置入等体积异丙醇, 摇匀后静置 8min。离心机 10000r/min 离心 15min 倒掉上清液, 置入和 RNAisoPlus 等容积 750mL/L 乙醇, 摇匀后离心机 8000r/min 离心 8min 倒掉上清液, 沉淀 5min, 置入无 RNA 酶行水溶解沉淀。(2) Perfect Real Time 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。使用 DEPC 水将提取的 8μL RNA 吹起, 2μL 逆转录反应混合物置入, 38℃ 下水浴 20min, 90℃ 下水浴 6s, 迅速冰浴。(3) Real time PCR 法检测眼眶脂肪组织内 AdPLA mRNA 表达状况。使用 SDS2.1 标准曲线对 mRNA 表达状况进行计算, 由曲线确定其周期阈值 (反映目标基因相对含量)。经过细胞中参照基因来对目标量进行划分, 以获取常态目标数值, 进行对 mRNA 表达状况确认。GAPDH 下游引物为 5'-TCAATCGACCTTGCCA-TGCA-3', 上游引物为 5'-GCAGGTTACATGCAGTCA-CGA-3'; AdPLA 下游引物为 5'-TCACACATCACACTCCTCAATC-3', 上游引物为 5'-TCGACTGGACCCATGAGCC-3'。

观察指标: 使用眼球突出计检测患者脂肪一侧眼球突出度, 并计算两组对象 BMI 状况。使用西门子 emotion16 排螺旋 CT 对两组对象眼眶行 CT 检测, 使用 Image J 软件利用水平位眼眶 CT 图像计算图片中眼眶脂肪的面积, 将面积乘以层厚再逐层相加计算得脂肪体积^[6]。

统计学分析: 使用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 计数资料两组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组对象年龄、性别、BMI 情况 观察组与对照组平均年龄、BMI 及性别对比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1), 甲状腺相关眼病患者典型眼像图片见图 1。

2.2 两组对象眼眶中脂肪含量、眼球突出度及脂肪组织内 AdPLA 表达情况 观察组患眼内脂肪含量、眼球突出度及组织内 AdPLA mRNA 表达量均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

本研究显示, TAO 患者患眼球突出程度高于正常人, 造成眼球突出的主要因素为眼眶内脂肪量增大。当前 TAO 患者眼球突出一般进行切除眼眶脂肪手术与眼眶减压手术, 但手术治疗的同时对患者可能存在以下风险, 比如泪道损害、视力下降或丧失、眶内神经受损、眼外肌功能异常、眼睑位置异常及脑脊液瘘等相关并发症^[7-8]。

TAO 患者眼眶内脂肪变多是由于脂肪细胞体积变大及数量变多所引起的。患者眼眶中前脂肪细胞在分化成熟细胞时脂肪细胞合成量增大; 另外, 脂肪细胞中对甘油三酯合成数量远高于分解数量, 从而造成细胞的体积大, 在上述因素影响下患者眼眶内容物变多, 进而使其眼球向外突出^[9-11]。对生成脂肪抑制仅仅是对新产生的细胞有抑制作用, 而对眼眶内已经堆积的脂肪则不能有效治疗, 相关专家认为只有加速脂肪水解才能够对由于组织堆积引发眼球突出者进行有效治疗^[12-14]。脂肪水解能够使细胞内甘油三酯转化为甘油与游离脂肪酸, 同时将其注入到循环内, 患者细胞体积降低、眼眶容积下降, 可恢复眼球突出^[15]。

脂肪水解中会受到相关激素与分泌因子调节, 而 AdPLA 为主要旁分泌与自分泌调控因子, AdPLA 水解的



图1 A、B:甲状腺眼病患者图片。

表1 两组年龄、性别、BMI 情况对比

组别	眼数	平均年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	BMI($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	男/女(例)
观察组	37	38.14 \pm 10.37	22.17 \pm 2.13	19/18
对照组	35	37.20 \pm 10.68	21.98 \pm 2.04	20/15
t/χ^2		0.964	0.952	0.853
P		0.683	0.518	0.492

注:观察组:进行眼眶减压手术的患者(静止期Ⅲ级);对照组:选取同期正常眼眶脂肪组织的美容、眼袋切除手术和上睑下垂矫正手术者。

表2 两组眼眶中脂肪含量、眼球突出度及脂肪组织内 AdPLA 表达情况对比

组别	眼数	脂肪含量(mL)	眼球突出度(mm)	AdPLA mRNA	$\bar{x} \pm s$
观察组	37	32.21 \pm 1.85	19.97 \pm 1.56	0.04 \pm 0.01	
对照组	35	24.05 \pm 1.64	14.07 \pm 1.48	0.01 \pm 0.003	
t		14.806	15.274	15.952	
P		0.001	0.003	0.014	

注:观察组:进行眼眶减压手术的患者(静止期Ⅲ级);对照组:选取同期正常眼眶脂肪组织的美容、眼袋切除手术和上睑下垂矫正手术者。

磷脂 sn-2 会形成 FFA 与花生四烯酸,后者可经过环氧和酶形成前列腺素 E2,脂肪细胞表层内 G α i 联合前列腺受体 3 与前列腺素 E2 结合,对腺苷酸环化酶有抑制影响,从而使眼眶内脂肪水解量降低。相关动物实验显示,大鼠模型内脂肪水解中 AdPLA 有重要作用,而缺失 AdPLA 的大鼠可无限制水解全身脂肪,但此种疗法在 TAO 患者中并不合适,但可采用 RNA 干扰技术对眼眶脂肪中 AdPLA 基因沉默,可能会只对眼眶内脂肪水解有影响而不会造成全身其他部位脂肪水解^[16-18]。本文研究显示,TAO 患眼组织内 AdPLA mRNA 表达数量比正常人显著升高,由此可推断,由于患眼内 AdPLA 表达量升高而造成其脂肪水解量降低,是眼球突出与脂肪堆积加重。

综上所述,TAO 患者眼内脂肪含量、眼球突出度及组织内 AdPLA mRNA 表达量均比正常人高,TAO 患者眼部脂肪组织内 AdPLA 表达量升高造成了其脂肪水解量降低,脂肪堆积量增大使其眼球突出程度加重。TAO 患者前期诊断中 AdPLA 可作为一个检测指标,但由于时间和人力等因素限制,本文未能对造成 TAO 患者 AdPLA 表达升高相关原因进行分析,这也为下一步进行更深入研究奠定了基础。

参考文献

- 余波,龚灿,涂云海,等. 甲状腺相关性眼病行内镜下内侧壁眶减压联合脂肪减压术后眼眶各容积参数的变化. 中国内窥镜杂志 2016;22(12):39-44
- Mendoza MC, Vilela M, Juarez JE, et al. ERK reinforces actin polymerization to power persistent edge protrusion during motility. *Science Signaling* 2015;8(37):47-52
- 陈欢欢,杨涛. 甲状腺相关性眼病发病机制研究进展. 中国实用内科杂志 2015;35(7):561-565
- 鞠卫萍,邢舒平. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与缺血性脑卒中关系的研究进展. 山东医药 2016;56(21):102-104

- Jiko C, Davies KM, Shinzawaitoh K, et al. Bovine F1Fo ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. *Elife* 2015;4(2):16-22
- 蒋丽琼,何小寒,刘桂琴,等. 利用 ImageJ 软件测量眼眶脂肪体积. 中国 CT 和 MRI 杂志 2016;14(3):11-13
- 柴佩韦. 硒补充疗法对甲状腺相关眼病治疗机制的研究进展. 中华实验眼科杂志 2017 35(9):857-861
- Leijnse N, Oddershede LB, Bendix PM. Helical buckling of actin inside filopodia generates traction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(1):136-139
- 王毅,杨娜,李月月,等. 微创多壁眼眶减压术治疗轻和度甲状腺相关性眼病的眼球突出. 中华眼科杂志 2017;53(2):310-312
- Welkos SL, Klimko CP, Kern SJ, et al. Characterization of Burkholderia pseudomallei Strains Using a Murine Intraperitoneal Infection Model and *In Vitro* Macrophage Assays. *PLoS One* 2015;10(4):667-672
- 戴雯,黄允,李艳. 血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 和游离脂肪酸水平与冠心病患者冠状动脉病变的关系. 微循环学杂志 2017;7(4):39-42
- 刘芳,朱豫,张珂,等. 激素冲击联合放射治疗重度活动期甲状腺相关性眼病疗效观察. 新乡医学院学报 2016;9(7):623-625
- 马全鑫,陈民利,王逸平. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抑制剂 Darapladib 的药效学研究进展. 中国药理学杂志 2015;50(4):317-322
- 王影,赵子德,柏梅,等. 针刺联合刺血疗法治疗中重度甲状腺相关性眼病 3 例. 中国中医眼科杂志 2015;25(5):371-373
- 吴桐,唐东润,孙丰源. 骨髓来源的纤维细胞与甲状腺相关性眼病的研究进展. 中华眼科杂志 2017;53(6):89-94
- Tamburino C, Latib A, van Geuns RJ, et al. Contemporary practice and technical aspects in coronary intervention with bioresorbable scaffolds: a European perspective. *Eurointervention* 2015;11(1):45-52
- 郭玲玲,杨国庆,谷伟军,等. 中重度甲状腺相关性眼病甲泼尼龙冲击短期疗效分析. 中华医学杂志 2015;95(20):1572-1575
- 陈俊,舒苏凤. 三壁微创眼眶减压术治疗重度甲状腺相关性眼病的护理. 浙江医学 2015;37(1):78-79