

引文格式: 蔡晶晶, 孟倩丽, 郭海科, 张良, 李东风, 崔颖. 血红素加氧酶-1 在糖尿病视网膜病变患者外周血单个核细胞中的表达[J]. 眼科新进展, 2014, 34 (1): 37-40. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0010

【应用研究】

血红素加氧酶-1 在糖尿病视网膜病变患者外周血单个核细胞中的表达[△]

蔡晶晶 孟倩丽 郭海科 张良 李东风 崔颖

作者简介: 蔡晶晶, 女, 1989 年 1 月出生, 硕士。联系电话: 15521116233; E-mail: haobao3489@sina.com

About CAI Jing-Jing: Female, born in January, 1989. Master degree. Tel: 15521116233; E-mail: haobao_3489@sina.com

收稿日期: 2013-10-18

修回日期: 2013-11-04

本文编辑: 方红玲

△基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 81371031); 广东省医学科研基金资助(编号: B2011013); 广州市珠江科技新星专项基金资助(编号: 2011J2200050)

作者单位: 510080 广东省广州市, 南方医科大学(蔡晶晶); 510080 广东省广州市, 广东省眼病防治研究所, 广东省人民医院眼科, 广东省医学科学院(蔡晶晶, 孟倩丽, 郭海科, 张良, 崔颖); 510080 广东省广州市, 广东省人民医院医学研究部(李东风)

通讯作者: 郭海科, E-mail: guohaike@medmail.com.cn

Received date: Oct 18, 2013

Accepted date: Nov 4, 2013

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81371031); Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (No: B2011013); Science and Technology Star of Zhujiang of Guangzhou City (No: 2011J2200050)

From the Southern Medical University (CAI Jing-Jing), Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Department of Ophthalmology, Guangdong General Hospital, Guangdong Eye Institute, Guangdong Academy of Medical Sciences (CAI Jing-Jing, MENG Qian-Li, GUO Hai-Ke, ZHANG Liang, CUI Ying), Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences (LI Dong-Feng), Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Responsible author: GUO Hai-Ke, E-mail: guohaike@medmail.com.cn

Expression of heme oxygenase-1 in peripheral blood mono-nuclear cells of diabetic retinopathy patients

CAI Jing-Jing, MENG Qian-Li, GUO Hai-Ke, ZHANG Liang, LI Dong-Feng, CUI Ying

【Key words】 diabetic retinopathy; heme oxygenase-1; oxidative stress; gene expression

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in peripheral blood mono-nuclear cells (PBMC) of patients with diabetic retinopathy (DR). **Methods** All of the durations of the diabetes courses were greater than 6 months. Eighteen patients with non-diabetic retinopathy (NDR group), 46 patients with DR (DR group) and 20 healthy controls (control group) were included in this study. There were 24 patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) and 22 patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR). Peripheral blood samples were obtained from all recruitments. HO-1 mRNA was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The correlation between the expression of HO-1 and some physical parameters was also analyzed. **Results** The results of qRT-PCR showed that the relative expressions of HO-1 mRNA in DR group, NDR group and control group were 0.015 ± 0.007 , 0.021 ± 0.010 and 0.027 ± 0.013 , there was statistical difference ($F = 10.888, P < 0.001$). The expression of HO-1 mRNA in DR group was significantly lower than those in the NDR group ($P = 0.014$). There was no significant difference in HO-1 mRNA between NDR group and control group ($P = 0.125$). Compared with NPDR group (0.018 ± 0.007), the relative expression of HO-1 mRNA was significantly lower in PDR group (0.012 ± 0.007) ($t = -3.052, P = 0.004$). There was a correlation between expression of \ln (HO-1) mRNA and systolic pressure ($\beta = -0.011, P = 0.001$), as well as glucosylated hemoglobin ($\beta = 0.088, P = 0.008$). **Conclusion** HO-1 mRNA expression is decreased in DR and PDR patients compared with the controls, indicating that HO-1 may play a protective role in DR development.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (1): 37-40]

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 血红素加氧酶-1; 氧化应激; 基因表达

【摘要】 **目的** 观察血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 在糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mono-nuclear cell, PBMC) 中的表达。 **方法** 选择糖尿病病程大于 6 个月的 2 型糖尿病患者共 64 例, 根据临床表现和诊断将其分为无糖尿病视网膜病变 (non-diabetic retinopathy, NDR) 组 18 例及 DR 组 46 例, 其中 DR 组中包括非增生型 DR (non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR) 患者 24 例及增生型 DR (proliferative retinopathy, PDR) 患者 22 例。选择同期行体检的健康志愿者 20 人作为对照。采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测各组 PBMC 中 HO-1 mRNA 的表达水平, 比较各组之间 HO-1 mRNA 表达水平的差异, 并分析 HO-1 mRNA 表达水平与各项理化指标之间的相关性。 **结果** qRT-PCR 检测发现, DR 组、NDR 组以及对照组 PBMC 中 HO-1 mRNA 相对表达量分别是 0.015 ± 0.007 、 0.021 ± 0.010 、 0.027 ± 0.013 , 差异有统计学意义 ($F = 10.888, P < 0.001$)。其中, DR 组 HO-1 mRNA 的相对表达量明显低于 NDR 组 ($P = 0.014$); NDR 组与对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.125$); PDR 组患者 PBMC 中 HO-1 mRNA 相对表达量为

0.012 ± 0.007 , 显著低于 NPDR 组 (0.018 ± 0.007) ($t = -3.052, P = 0.004$)。ln (HO-1) mRNA 表达水平与收缩压 ($\beta = -0.011, P = 0.001$) 及糖化血红蛋白 ($\beta = 0.088, P = 0.008$) 之间存在显著相关性。结论 HO-1 mRNA 在 DR 患者及 PDR 患者 PBMC 中的表达显著降低, 提示 HO-1 可能作为一个保护性因素参与 DR 的发生及病情进展。

[眼科新进展, 2014, 34 (1): 37-40]

氧化应激机制与糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 发生的关系逐渐成为近年来研究的热点。血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 一直被认为具有良好的抗氧化应激、抗炎、抗细胞凋亡以及抗细胞增殖的功能。有研究发现 HO-1 在高糖培养的视网膜细胞以及糖尿病动物模型的视网膜上存在异常表达^[1-2]。Da 等^[3]分离供体眼球的视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞, 发现糖尿病患者 HO-1 mRNA 表达低于正常组及高血压组, 但是其在 DR 患者中的表达情况尚不清楚。因此, 为了探讨 HO-1 在 DR 发病机制中的作用, 本研究观察了 HO-1 在 2 型糖尿病患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mono-nuclear cell, PBMC) 中的表达, 以期阐明 DR 的发病机制、寻求新的治疗靶点提供一定的理论依据和实验基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2011 年 11 月至 2012 年 12 月在广东省人民医院眼科和内分泌科住院治疗的 64 例 2 型糖尿病患者纳入本研究, 其糖尿病病程均大于 6 个月。所有受试者通过实验室检查排除严重心血管疾病、外周动脉粥样硬化、肝肾及肿瘤疾病, 以及近期无急性感染病史。所有患者签署知情同意后均进行了视力、眼压、裂隙灯显微镜眼前节、前置镜眼底检查, 糖尿病患者中眼底分期难以区分的患者还进行了眼底荧光血管造影 (fluorescein fundus angiography, FFA) 检查。综合前置镜眼底检查、眼底彩色照相以及 FFA 检查结果, 根据国际 DR 严重程度分级标准^[4], 将 64 例 2 型糖尿病患者分为糖尿病无视网膜病变 (non-diabetic retinopathy, NDR) 组 (18 例)、DR 组 (46 例)。其中 DR 组中包括非增生型 DR (non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR) 患者 24 例, 眼底主要表现为微血管瘤、出血、渗出、视网膜水肿等体征; 增生型 DR (proliferative retinopathy, PDR) 患者 22 例, 眼底主要表现为视盘新生血管、玻璃体积血或合并纤维增殖膜、视网膜脱离等。对照组为年龄大于 40 岁, 且血压、血糖和血脂均正常的 20 名同期参加体检的健康志愿者。

1.2 方法

1.2.1 体检和生化检查 空腹 30 min, 静息 15 min 后, 采用电子血压仪测量受试者坐位时上臂血压。禁食 10 h 后第 2 天清晨采空腹静脉血, 测定血常规、丙氨酸转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、血肌酐。对于糖尿病患者, 采用离子交换高效液相色谱

分析法测量糖化血红蛋白 (HbA1c) 含量。

1.2.2 PBMC 总 RNA 提取 按照常规方法, 取新鲜外周血 2 mL 入 EDTA 试管, 应用淋巴细胞分离液 (TBD 公司, 中国) 分离 PBMC, 用 Trizol 抽提液 (TAKARA 公司, 日本) 提取总 RNA, 测定其 260 nm 和 280 nm 的吸收率, 计算纯度和含量。比值在 1.8 ~ 2.0 者作为合格标本进行逆转录试验。

1.2.3 逆转录-实时荧光定量聚合酶链式反应 使用逆转录试剂盒 (TAKARA 公司, 日本)。采用 Primer5.0 软件设计引物, 引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成。HO-1 上游引物为: 5'-CTTCTTCAC-CTTCCCCAACA-3', 下游引物为: 5'-GCTCTGGTC-CTTGGTGTCTAT-3'; 产物长度为 193 bp。β-肌动蛋白 (β-actin) 为内参; β-actin 上游引物: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 下游引物为: 5'-CTC-CTTAATGTCACGCACGAT-3', 产物长度为 250 bp。总反应体系为 10 μL, 其中逆转录反应缓冲液 2 μL, 总 RNA 浓度为 500 μg · L⁻¹, 另加无 RNA 酶水定容至 10 μL。逆转录条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 下将 cDNA 按总反应体系 10 μL 配制, 使用实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒进行反应。其中 cDNA 1 μL, 灭菌蒸馏水 3.2 μL, qRT-PCR 上游引物 0.4 μL, 下游引物 0.4 μL, 2 倍 Taq 聚合酶染料反应缓冲液 5.0 μL。混匀放入荧光定量 PCR 仪器里。反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 进行 40 个循环。所有样本均采用三复孔进行试验。反应结束后电脑自动绘出各自的标准曲线, 以溶解曲线为单一峰形、出峰位置为退火温度代表产物特异性好。由软件自动计算出待测样品中目的基因和管家基因的准确含量。使用相对表达量作为评价目的基因表达水平的指标, 相对表达量为 $2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}}$, Ct 为热循环仪检测到反应体系中荧光信号的临界循环数值。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计学软件行统计学处理。连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据资料的方差齐性检验采用 Levene 法, 组间基因表达的总体比较采用 ANOVA 方差分析或两独立样本 t 检验, 多重比较采用 LSD 法。直线相关采用 Pearson 分析方法, 其他资料则采用 Spearman 分析方法进行相关分析。多元回归分析法分析 HO-1 表达与各因素间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般结果 NDR 组、NPDR 组、PDR 组、对照组

性别、收缩压、舒张压、高血压病史、现阶段胰岛素使用史、AST 和 ALT 比较,差异均无统计学意义。各组中的年龄、糖尿病病程、HbA1c、血肌酐比较,差异均有统计学意义。NDR 组、NPDR 组及 PDR 组进行两两比较发现,PDR 组年龄为 (51.5 ± 8.0) 岁,显著小于 NDR 组的 (61.3 ± 12.0) 岁及 NPDR 组的 (66.9 ± 9.0) 岁 ($P=0.021, 0.001$); NDR 组及 PDR 组糖尿病病程明显低于 NPDR 组; PDR 组的 HbA1c 值为 $(7.6 \pm 1.7)\%$,明显低于 NDR 组的 $(9.3 \pm 2.2)\%$ 及 NPDR 组的 $(9.5 \pm 2.6)\%$ ($P=0.005, 0.002$),而该组的血肌酐水平为 $(191 \pm 179) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,明显高于 NDR 组的 $(69 \pm 18) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 NPDR 组的 $(68 \pm 18) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P=0.004, 0.005$)。

2.2 HO-1 mRNA 的表达 qRT-PCR 检测发现,HO-1 获得理想的单一峰形熔解曲线,其扩增产物的特异性好(图 1)。DR 组、NDR 组以及对照组 PBMC 中 HO-1 mRNA 相对表达量分别为 0.015 ± 0.007 、 0.021 ± 0.010 、 0.027 ± 0.013 ,差异有统计学意义 ($F=10.888, P<0.001$)。其中,DR 组 HO-1 mRNA 的相对表达量明显低于 NDR 组 ($P=0.014$),NDR 组与对照组比较,差异无统计学意义 ($P=0.125$)。进一步对 DR 组中 NPDR 患者和 PDR 患者分析显示,PDR 组患者 PBMC 中 HO-1 mRNA 相对表达量为 0.012 ± 0.007 ,显著低于 NPDR 组 (0.018 ± 0.007),差异有显著统计学意义 ($t=-3.052, P=0.004$)。

Figure 1 Dissociation curve of HO-1 and β -actin. A: HO-1; B: β -actin

2.3 DR 患者 HO-1 mRNA 表达的相关因素分析 将 HO-1 mRNA 表达量进行 $\ln(\text{HO-1})$ 正态转换,相关分析结果显示, $\ln(\text{HO-1})$ 与收缩压 ($r=-0.357, P=0.009$)、HbA1c ($r=0.263, P=0.046$) 存在显著

HO-1、 β -actin 熔解曲线图。A: HO-1 熔解曲线; B: β -actin 熔解曲线

相关(图 2)。多重线性回归分析发现, $\ln(\text{HO-1})$ (Y) 与收缩压 (X_1) ($\beta=-0.011, P=0.001$) 及 HbA1c (X_2) ($\beta=0.088, P=0.008$) 独立相关,回归方程为 $Y=-3.416-0.011X_1+0.088X_2$ 。

Figure 2 Correlation between expression of $\ln(\text{HO-1})$ mRNA and systolic pressure, glucosylated hemoglobin $\ln(\text{HO-1})$ mRNA 表达与收缩压及 HbA1c 的相关分析

3 讨论

DR 属于糖尿病微血管并发症之一,严重者可以致盲。大量的研究表明,氧化应激反应对 DR 的发展,尤其是对视网膜内皮细胞功能的失调及死亡具有重要作用^[5]。既往研究证实,在体外细胞培养及动物模型中,HO-1 在 RPE 细胞、内皮细胞、光感受器

细胞、神经节细胞、Müller 细胞中均有表达,在应激状态下其表达增高^[2,6-8]。有研究发现,HO-1 能够通过抗氧化应激、抗炎、抗凋亡、抗增殖效应来保护视网膜神经节细胞的功能。HO-1 表达的升高与 Nrf2/ERK 信号通路激活有关,还可能与调控诱导超氧化物歧化酶-1 的表达,以及抑制缺氧诱导因子-1 α 、P53、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth

factor, VEGF) 水平相关^[9]。对糖尿病小鼠的研究发现,在病程早期,HO-1 在视网膜组织中的表达升高,但是随着病情的进展,HO-1 的表达降低,进而导致抗氧化应激作用降低^[1]。

本研究证实,DR 患者的 HO-1 mRNA 的相对表达量明显低于未发生视网膜病变的糖尿病患者,提示 HO-1 表达水平的降低可能是导致 DR 发生的原因之一。本研究对 DR 患者的进一步分析发现,PDR 患者 PBMC 中 HO-1 mRNA 表达含量明显低于 NPDR 患者,提示 HO-1 可能参与了 DR 的病情进展,其表达水平的降低可能加剧了 DR 的严重程度。由此我们推测,外周血 PBMC 中 HO-1 的高表达可能对 DR 的发生发展是一个保护因素。

然而 Zhang 等^[10]研究发现,采用转染 HO-1 siRNA、原锌卟啉抑制 HO-1 活性、缺氧情况下敲除 HO-1 等方法,均能显著降低人 RPE 细胞中 VEGF 的表达,提示 HO-1 具有促进新生血管化的作用。因此,为进一步明确 HO-1 在 DR 进展中的作用,尚需探讨 HO-1 在 DR 患者眼局部的表达情况,同时借助糖尿病动物模型以及体外视网膜细胞培养等进一步阐明其作用机制。

本研究对 DR 患者的基本情况及理化检查指标进行分析发现,PDR 患者的年龄、糖尿病病程及 HbA1c 水平均明显低于 NPDR 患者。我们推测这可能与高血糖的“代谢记忆”有关。所谓“代谢记忆”,是指糖尿病患者的高血糖水平如果在发病早期不能得到及时控制,即使后期持续稳定在正常水平,DR 等慢性并发症仍然会继续发展,难以逆转。炎症因子瀑布、氧化应激增强以及表观遗传修饰的变化等在高血糖“代谢记忆”现象发生发展中发挥重要作用^[11]。此外,糖尿病患者年龄较小^[12]、空腹血糖波动^[13]等均可导致 PDR 的发生发展。

糖尿病肾病与 DR 均是糖尿病重要的微血管并发症,二者之间存在着共同的发病机制,如遗传因素、糖基化终末产物、多元醇通路、蛋白激酶 C 激活、细胞因子、免疫炎症因素等^[14]。因此,有研究证实二者在临床中可以相互评估^[15-16]。本研究发现,PDR 患者血肌酐含量显著高于 NPDR 患者及未出现视网膜病变的糖尿病患者,提示 PDR 的发生与肾脏的损害可能存在更加密切的关系。此外,我们发现 DR 患者外周血 HO-1 mRNA 的表达与收缩压具有相关性,这可能与 HO-1 通过调节血管功能和肾脏功能进而参与血管减压调节的作用有关^[17]。

综上所述,本研究发现,在糖尿病病程大于 6 个月的 2 型糖尿病患者中,其 PBMC 中 HO-1 mRNA 的表达显著低于未出现视网膜病变的糖尿病患者,其

在 PDR 患者中的表达明显低于 NPDR 患者,提示了 HO-1 表达水平的降低可能是导致 DR 发生发展的原因之一,而增加 HO-1 的含量可能是治疗 DR 的新途径。

参考文献

- He M, Pan H, Xiao C, Pu M. Roles for redox signaling by NADPH oxidase in hyperglycemia-induced heme oxygenase-1 expression in the diabetic retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (6):4092-4101.
- Cukiernik M, Mukherjee S, Downey D, Chakabarti S. Heme oxygenase in the retina in diabetes [J]. *Curr Eye Res*, 2003, 27 (5):301-308.
- Da SJ, Stoltz RA, Dunn MW, Abraham NG, Shibahara S. Diminished heme oxygenase-1 mRNA expression in RPE cells from diabetic donors as quantitated by competitive RT/PCR [J]. *Curr Eye Res*, 1997, 16 (4):380-386.
- Wilkinson CP, Ferris FR, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales [J]. *Ophthalmology*, 2003, 110 (9):1677-1682.
- Du Y, Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287 (4):735-741.
- Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, Greenwood J, Luthert PJ, Cheetham ME. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (2):675-684.
- Arai-Gaun S, Katai N, Kikuchi T, Kurokawa T, Ohta K, Yoshimura N. Heme oxygenase-1 induced in müller cells plays a protective role in retinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (11):4226-4232.
- Ulyanova T, Szel A, Kutty RK, Wiggert B, Caffé AR, Chader GJ, et al. Oxidative stress induces heme oxygenase-1 immunoreactivity in müller cells of mouse retina in organ culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42 (6):1370-1374.
- Fan J, Xu G, Jiang T, Qin Y. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (10):6541-6556.
- Zhang W, Zhang X, Lu H, Matsukura M, Zhao J, Shinohara M. Silencing heme oxygenase-1 gene expression in retinal pigment epithelial cells inhibits proliferation, migration and tube formation of cocultured endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434 (3):492-497.
- Zhang L, Chen B, Tang L. Metabolic memory: mechanisms and implications for diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 96 (3):286-293.
- 胡安娣娜, 李涛, 罗燕, 丁小燕, 朱晓波, 李士清, 等. 增殖性糖尿病视网膜病变的危险因素分析 [J]. 中国实用眼科杂志, 2011, 29 (9):925-928.
- Takao T, Ide T, Yanagisawa H, Kikuchi M, Kawazu S, Matsuyama Y. The effect of fasting plasma glucose variability on the risk of retinopathy in type 2 diabetic patients: retrospective long-term follow-up [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 89 (3):296-302.
- 李艳, 李东豪. 糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病相关关系的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2012, 12 (7):1285-1288.
- Parving HH, Mogensen CE, Thomas MC, Brenner BM, Cooper ME. Poor prognosis in proteinuric type 2 diabetic patients with retinopathy: insights from the RENAAL study [J]. *QJM*, 2005, 98 (2):119-126.
- 凌云. 糖尿病视网膜病变与糖尿病肾病早期关系的分析 [J]. 实用中西医结合临床, 2009, 24 (1):46-47.
- 韩玉祯, 陈明. 血红素加氧酶-1 在肾脏功能及血压调节中的作用 [J]. 山东医药, 2012, 38 (19):97-99.