

【应用研究】

糖尿病合并高度近视患者玻璃体中 VEGF 和 EPO 的表达及意义[△]

Expression and significance of VEGF and EPO in vitreous body of diabetes mellitus with high myopia

度与 DR 的程度呈负 行玻璃体切割术患者的术中采集到的玻璃体原液,

相关。长眼轴以及高度近视已经被证实为 DR 的保护性因素^[3,4]。DR 的发病机制非常复杂,高度近视对 DR 发展影响的机制尚不明确。为了进一步观察高度近视与 DR 程度的关系,本研究通过对在我院行玻璃体切割术患者的术中采集到的玻璃体原液,

采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的含量,初步探讨高度近视对DR的影响及其机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 自2011年1月至2012年12月郑州大学第一附属医院眼科玻璃体视网膜病组收治的患者中,选取待行玻璃体手术的视网膜脱离患者62例(62眼),分4组,其中对照组18例,男10例,女8例,年龄为 (42.6 ± 14.8) 岁,均为正视眼,孔源性视网膜脱离待行玻璃体切割术,排除糖尿病及眼部其他疾病;高度近视组16例,其中男9例,女7例,年龄为 (44.1 ± 15.3) 岁,屈光度在 -6.0 D以上,孔源性视网膜脱离待行玻璃体切割手术,无糖尿病及眼部其他疾病;增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)组15例,其中男9例,女6例,年龄为 (52.6 ± 10.2) 岁,确诊为糖尿病患者(糖尿病符合1999年WHO标准^[5]),正视眼,眼底情况为DR VI期(出现牵拉性视网膜脱离),排除玻璃体积血患者,待行玻璃体切割术,排除眼部其他疾病;高度近视合并糖尿病组13例,其中男7例,女6例,年龄为 (42.6 ± 14.8) 岁,确诊为糖尿病患者,屈光度在 -6.0 D以上,孔源性视网膜脱离待行玻璃体切割术,排除眼部其他疾病。4组间患者性别构成比例和年龄差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。

1.2 标本的采集 术前散瞳,球后麻醉,做常规睫状体平坦部三切口,预置灌注头,玻璃体切割头及导光照明纤维进入眼内,玻璃体切割手术开始时关闭灌注管,将5 mL 无菌注射器连接于玻切头,直视下切除抽吸玻璃体,获得0.5 mL 非稀释的玻璃体原液标本,随即打开眼内灌注继续手术,术中根据患者眼底情况进行相应的操作,如进行视网膜激光光凝、冷凝、硅油注入等操作,将抽得的玻璃体原液迅速转移至已消毒并硅化的EP管内,置于 -80 °C超低温冰箱保存。

1.3 VEGF、EPO浓度的测量 应用ELISA法,抗人VEGF单抗包被于酶标板上,将4组患者玻璃体标本中的VEGF与单抗特异性结合,然后加入二抗(生物素化抗人VEGF),与结合在单抗上的人VEGF结合形成免疫复合物,洗去未结合的多余二抗,由辣根过氧化物酶标记的Streptavidin与二抗的生物素结合,最后加入显色液显色,用酶标仪在波长450 nm条件下测定各孔的吸光度值,由于人VEGF的浓度与光密度值(optical density, OD)呈正比,根据不同浓度标准品所测的吸光度值绘制标准曲线,在标准曲线上查出相应VEGF含量。以生物素化抗人EPO为二抗采用同样的方法测量4组标本EPO浓度值。

1.4 统计学分析 本研究结果用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,用

SPSS 11.0 软件进行数据分析,所得数据符合正态分布;本研究中多个样本均数的两两比较运用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

对照组玻璃体中VEGF、EPO浓度为 (152.8 ± 35.2) pg · mL⁻¹、 (74.3 ± 16.5) U · L⁻¹;高度近视组玻璃体中VEGF、EPO浓度为 (81.3 ± 17.5) pg · mL⁻¹、 (65.1 ± 13.7) U · L⁻¹;PDR组玻璃体中VEGF、EPO浓度为 (826.3 ± 363.2) pg · mL⁻¹、 (649.8 ± 267.9) U · L⁻¹;高度近视合并糖尿病组玻璃体中VEGF、EPO浓度为 (309.4 ± 138.7) pg · mL⁻¹、 (156.2 ± 56.7) U · L⁻¹。高度近视合并糖尿病组VEGF和EPO浓度均低于PDR组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);PDR组VEGF和EPO浓度值均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);高度近视组VEGF浓度低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),EPO浓度低于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

DR是糖尿病患者最常见的并发症之一,长期高血糖状态对视网膜微血管造成损伤,易引起眼底出血及纤维增殖膜形成,发展为PDR,最终导致牵拉性视网膜脱离,造成失明,严重影响人们的生活质量^[6]。视网膜新生血管形成在DR的发展中起了关键作用。多数学者认为VEGF和EPO在DR发生发展中起重要作用^[7-8]。VEGF是一种主要的诱导血管再生的细胞因子,是DR发生发展过程中一个关键性的调节因子。研究证实,应用VEGF抑制剂可以抑制视网膜新生血管的形成^[9],减少DR黄斑水肿的发生^[10],从而对DR起到一定的治疗作用。近年来研究发现,EPO作为一种能促进新生血管形成的独立作用因子^[11],与PDR也存在某种联系,这种联系与VEGF无关,且比VEGF更强^[12]。糖尿病大鼠模型证实,在糖尿病形成6个月左右,EPO在糖尿病大鼠视网膜组织上表达明显增强,随病程延长、缺氧程度的加重,EPO表达强度增强,使视网膜病理损害随之加重^[13]。

在临床工作中发现,部分糖尿病患者双眼视网膜病变的严重程度不一致,尤其是单眼高度近视的糖尿病患者。在同一糖尿病患者屈光参差的眼中,近视程度较高的眼DR严重程度比另一眼病变程度明显较轻。还有研究表明,近视、眼轴长患者发生DR的几率小;近视程度越高,DR病变程度越轻,尤其是发生危及视力的重度DR几率更小^[14]。因此,研究高度近视对DR保护作用的机制和可能的作用途径对DR的防治具有重要意义。

本研究通过对DR发生发展中影响视网膜新生血管形成的VEGF和EPO进行研究,以探讨高度近

视阻滞 DR 发展的机制。本研究采用 ELISA 法检测 VEGF 和 EPO 在对照组、高度近视组、PDR 组和高度近视合并糖尿病组患者玻璃体中的表达情况,结果显示 PDR 组玻璃体中 VEGF、EPO 浓度为 $(826.3 \pm 363.2) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(649.8 \pm 267.9) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,而高度近视合并糖尿病组玻璃体中 VEGF、EPO 浓度为 $(309.4 \pm 138.7) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(156.2 \pm 56.7) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,高度近视合并糖尿病组玻璃体中 VEGF、EPO 浓度明显低于 PDR 组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。

由于 VEGF 和 EPO 的表达受视网膜供氧状况的影响较大,我们分析高度近视对 VEGF 和 EPO 表达的抑制作用可能与高度近视对视网膜缺氧状况改善有关。高度近视眼视网膜被拉伸,面积增大,厚度变薄,而视网膜血管也变细变长,因此使视网膜血管的压力衰减系数增大,从而导致末梢血管灌注压下降,改善了 DR 早期视网膜微血管的高灌注状态^[15]。高度近视眼中脉络膜、视网膜萎缩,视网膜代谢率下降,氧更易于透过视网膜,弥散阻力减弱,相对薄弱的视网膜可以从脉络膜汲取更多的氧,改善了视网膜缺氧状态,将会降低 VEGF 和 EPO 的表达量。已有较多研究表明,VEGF 在 DR 的增殖期和背景期均表达增高,VEGF 是被缺氧诱导的血管再生因子和血管渗透性因子^[16-19]。Kase 等^[12]研究表明:EPO 受体在 PDR 患者的增殖膜微血管中呈强阳性表达,玻璃体中的 EPO 与增殖膜上的 EPO 受体结合,最终导致了新的视网膜新生血管形成。高度近视眼视网膜缺氧状况的改善可能是糖尿病合并高度近视眼视网膜 VEGF 和 EPO 低表达的原因,从而阻滞 DR 的发生和发展。

综上所述,高度近视对糖尿病患者玻璃体中 VEGF 和 EPO 表达具有一定影响,这些因子的低表达可能在高度近视阻滞 DR 的发生发展中发挥作用。本研究中我们仅对玻璃体中 VEGF 和 EPO 浓度进行检测分析,而未对高度近视通过何种途径影响 VEGF 和 EPO 的表达进行研究,我们将在今后的工作中进一步研究。

参考文献

1 Xie XW, Xu L, Jonas JB, Wang YX. Prevalence of diabetic reti-

nopathy among subjects with known diabetes in China; the Beijing Eye Study [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2009, 19(1): 91-99.

2 Klein BE. Overview of epidemiologic study of diabetic retinopathy [J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2007, 14(4): 179-183.

3 万光明,孔晓路,王爽. 糖尿病合并高度近视动物模型的制作 [J]. 眼科研究, 2009, 27(6): 511-513.

4 赵菊莲,王婵婵,毛新邦,王娟娟. 高度近视与非对称性糖尿病视网膜病变的关系 [J]. 中华眼底病杂志, 2012, 28(3): 286-287.

5 Botas P, Delgado E, Castano G, Díaz de Grenu C, Prieto J, Díaz-Cadómiga FJ. Comparison of the diagnostic criteria for diabetes mellitus, WHO-1985 ADA-1997 and WHO-1999 in the adult population of Asturias [J]. *Diabet Med*, 2003, 20(11): 904-908.

6 Moss SE, Klein R, Klein BE. The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population [J]. *Ophthalmology*, 1998, 105(6): 998-1003.

7 Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(8): 782-792.

8 李艳,李筱荣,袁佳琴,潘斌. 糖尿病大鼠视网膜中 VEGF、PEDF 的表达与血-视网膜屏障损伤 [J]. 眼科新进展, 2013, 33(1): 29-32.

9 Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM, Cunningham ET Jr, Davis MD, Goldbaum M, et al. Change in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113(1): 23-28.

10 Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, Aiello LP, Bressler NM, D'Amico DJ, et al. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer for diabetic macular edema [J]. *Ophthalmology*, 2005, 112(10): 1747-1757.

11 Yasuya L, Akira H. Elevated erythropoietin in vitreous with ischemic retinal disease [J]. *J Neuroreport*, 2004, 15(5): 877-879.

12 Kase S, Saito W, Ohgami K, Yoshida K, Furudate N, Saito A, et al. Expression of erythropoietin receptor in human epiretinal membrane of proliferative diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91(10): 1376-1378.

13 李厚硕,王惠英,荣翱. 促红细胞生成素在糖尿病大鼠视网膜中的表达 [J]. 同济大学学报(医学版), 2012, 33(2): 15-18.

14 Lim LS, Lamoureux E, Saw SM, Tay WT, Mitchell P, Wong TY. Are myopic eyes less likely to have diabetic retinopathy? [J]. *Ophthalmology*, 2010, 117(3): 524-530.

15 Stefánsson E. Ocular oxygenation and the treatment of diabetic retinopathy [J]. *Surv Ophthalmol*, 2006, 51(4): 364-380.

16 Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 1994, 118(4): 445-450.

17 Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability and angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(5): 1029-1039.

18 Zhu H, Shi CH. Prospect of correlated techniques for diagnosis of diabetic retinopathy [J]. *Int J Ophthalmol*, 2005, 5(5): 1016-1019.

19 Hu CL, Chen W, Hui YN. The significance of expression of MMP-3 and VEGF in the retina of diabetic rats at early stage induced by streptozotocin [J]. *Int J Ophthalmol*, 2004, 4(4): 615-617.