引文格式:韩治华,杨淑焕,郭卫民,刘喜燕. TGF-β 介导的 Smad 信号通路在增生型糖尿病视网膜病变中的作用和意义[J]. 眼科新进展,2016,36(10):957-960. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0256

【应用研究】

TGF-β 介导的 Smad 信号通路在增生型糖尿病视网膜病变中的作用和意义

韩治华 杨淑焕 郭卫民 刘喜燕

作者简介:韩治华,女,1979 年 12 月出生,山西人,硕士研究生,主治医师。联系电话:13384973698;E-mail:1041851031@qq.com;ORCID:0000-0003-3688-471X

About HAN Zhi-Hua: Female, born in December, 1979. Master degree. Tel: 13384973698; E-mail: 1041851031@qq.com; ORCID: 0000-0003-3688-471X

收稿日期:2015-12-07
修回日期:2016-05-06
本文编辑:付中静

作者单位:710003 陕西省西安市,陕西省中医医院眼科(韩治华,杨淑焕,郭卫民);710003 陕西省西安市,陕西省中医医院脾胃科(刘喜燕)
通讯作者:刘喜燕,E-mail:420635257@qq.com;ORCID:0000-0002-4705-0131

Received date: Dec 7, 2015
Accepted date: May 6, 2016

From the *Department of Ophthalmology, Shaanxi Province Hospital of Traditional Chinese Medicine* (HAN Zhi-Hua, YANG Shu-Huan, GUO Wei-Min), *Xi'an* 710003, *Shaanxi Province, China*; *Department of Spleen and Stomach, Shaanxi Province Hospital of Traditional Chinese Medicine* (LIU Xi-Yan), *Xi'an* 710003, *Shaanxi Province, China*
Responsible author: LIU Xi-Yan, E-mail: 420635257@qq.com; ORCID: 0000-0002-4705-0131

Role and significance of TGF-β mediated Smad signaling pathways in proliferative diabetic retinopathy

HAN Zhi-Hua, YANG Shu-Huan, GUO Wei-Min, LIU Xi-Yan

【Key words】 transforming growth factor -β; Smad; proliferative diabetic retinopathy

【Abstract】 **Objective** To observe the role and significance of transforming growth factor-β (TGF-β) mediated Smad signaling pathways in the proliferative diabetic retinopathy (PDR), and illustrate its possible pathogenesis. **Methods** Diabetic patients were divided into two groups on the basis of the retinal involvement degree: Non-diabetic retinopathy (NDR), diabetic retinopathy (DR). According to retina changes, DR were divided into two subtypet: Non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR), proliferative diabetic retinopathy (PDR). The blood samples from normal people and diabetic patients were detected to analyze secretion level of TGF-β_1 and TGF-β_2 by ELISA and the protein expression level of TGF-β_1, TGF-β_2, Smad3, p-Smad3 by Western blot in serum. **Results** Compared with normal group, the secretion and relative protein expression of TGF-β_1, TGF-β_2 were significantly higher in diabetic patients (all $P<0.05$), the relative protein expression of p-Smad3 was also clearly higher in diabetic patients (all $P<0.05$); Compared with NDR, the results were similar (all $P<0.05$); Subgroup analysis showed that the above indexes were significantly higher in PDR than NPDR patients (all $P<0.05$). **Conclusion** TGF-β mediated Smad signaling pathways involves in the occurrence of DR, which may be important pathological mechanism in PDR.

【中图分类号】 R774.1
【关键词】 转化生长因子-β;Smad;增生型糖尿病视网膜病变

【摘要】 **目的** 本研究旨在观察转化生长因子 β(transforming growth factor-beta, TGF-β)介导的 Smad 信号通路在增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)中的作用和意义,进而阐明其可能的发病机制。**方法** 收集正常人和糖尿病患者的血液标本,将糖尿病患者依据视网膜受累程度分为 2 组:无糖尿病视网膜病变(non-diabetic retinopathy, NDR)组、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)组,根据眼底改变又分为非增生型糖尿病视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)组和增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)组。分别用 ELISA 检测正常人和糖尿病患者血浆中的 TGF-β_1 和 TGF-β_2,Western blot 检测血浆中 TGF-β_1、TGF-β_2、Smad3 和 p-Smad3 的蛋白表达量,比较各组差异。**结果** 与对照组比较,糖尿病患者各组 TGF-β_1 和 TGF-β_2 分泌量和 TGF-β_1、TGF-β_2、p-Smad3 的蛋白表达量均明显升高(均为 $P<0.05$);与 NDR 组比较,DR 各组上述指标均显著增高(均为 $P<0.05$);PDR 组上述指标均显著高于 NPDR 组(均为 $P<0.05$)。**结论** TGF-β 介导的 Smad 信号通路参与了 DR 的发生,可能是介导 PDR 发生的重要机制。

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的主要慢性微血管并发症之一,有研究表明,在我国的 2 型糖尿病患者中,病程在 5 a 的 DR 发生率为 24% ~40%,病程超过 10 a 者可高达 53% ~84%[1],其中增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)占 5% ~8%[1],但其发病机制尚未明确,目前 PDR 的发病和进展也成为了该领域的热点问题。

转化生长因子 β(transforming growth factor-beta, TGF-β)眼内来源广泛,眼前后段各种组织中角膜、虹膜、晶状体上皮细胞、小梁网细胞、睫状体上皮细胞和视网膜色素上皮细胞均能合成和分泌。TGF-β 可由高血糖等多种因素刺激产生。研究显示 DR 患者血清中 TGF-β 含量明显高于健康人群,并随病程

的延长及眼部病情的加重而增高[2]。PDR是一种视网膜缺血诱发新生血管异常生长与继发性纤维组织增殖,是发生在视网膜前的异常增殖和纤维化的疾病。TGF-β在细胞生长、分化中发挥重要作用,广泛存在于人体的细胞和组织中,被认为是促进纤维化发展的重要细胞因子。有研究显示TGF-β介导的信号通路在纤维化疾病中发挥重要作用,如后发性白内障和前囊膜下白内障[3]。那么在PDR的发生中TGF-β介导的信号通路是否参与其发生尚待进一步研究证实。因此本研究针对TGF-β介导的经典的Smad信号通路在PDR患者中的作用进行研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料与分组 选择2014年3月至2015年6月间在陕西省中医院门诊就诊的糖尿病患者90例(125眼,均符合1998年WHO糖尿病诊断标准),所有患者行眼底荧光血管造影检查,其中无糖尿病视网膜病变(non-diabetic retinopathy,NDR)组35例(48眼),男18例(25眼),女17例(23眼),年龄38~76(61.2±9.3)岁,糖尿病病程1~23 a。其中糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)根据眼底病变分为非增生型糖尿病视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy,NPDR)组35例(49眼),男16例(23眼),女19例(26眼);年龄41~77(62.2±11.3)岁,糖尿病病程4~18 a。增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy,PDR)组20例(28眼),男10例(15眼),女10例(13眼);年龄45~81(63.2±10.6)岁,糖尿病病程12~22 a。选取同期体检健康者52例(73眼)为对照组,男28例(39眼),女24例(34眼),年龄50~72(60.4±9.3)岁。所有正常人均无糖尿病家族史,空腹血糖以及糖耐量正常;所有患者和对照组均无心、肺、肝、肾、肿瘤疾病,无外伤及手术史。4组在性别构成、年龄方面比较差异均无统计学意义(均为$P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 4组受试者均于空腹过夜8 h后清晨采集肘静脉血10 mL,置于含EDTA抗凝剂的真空管内3000 r·min^{-1}离心5 min,取上清液,分装后将血清置于-80 ℃冷冻保存备用。

1.2.2 主要试剂 TGF-β_1、Smad3、p-Smad3、β-tubulin均为兔单克隆抗体(Abcam,CA,USA),TGF-β_2兔单克隆抗体(Millipore,Bedford,MA,USA)。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(碧云天,中国)。

1.2.3 ELISA检测4组血清中TGF-β_1和TGF-β_2分泌量 采用ELISA试剂盒(美国eBioscince公司)检测人血清中TGF-β_1和TGF-β_2分泌量。按照说明书先激活血清标本,取出抗体包被的板条,空白孔加标本通用稀释液,其余相应孔加标本和不同浓度标准品(每孔100 μL),用封胶纸封住反应孔,36 ℃孵育90 min,洗板5次。空白孔加生物素化抗体稀释液,其余孔加生物素化抗体工作液(每孔100 μL),用新封胶纸封住反应孔,36 ℃孵育60 min,洗板5次。空白孔加酶结合物稀释液,其余孔加酶结合物工作液(每孔100 μL),用封胶纸封住反应孔,36 ℃避光孵育30 min,洗板5次。加入显色底物(TMB)每孔100 μL,避光孵育15 min,加入终止液每孔100 μL,混匀后即刻测量OD值。

1.2.4 Western blot检测4组血清中TGF-β_1、TGF-β_2和Smad3/p-Smad3蛋白表达 用血液总蛋白快速提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取血清中的总蛋白。提取蛋白后酶标仪检测蛋白浓度,计算含25 μg蛋白的溶液为上样量,与蛋白上样缓冲液混合后100 ℃加热10 min使其变性,加入配置好的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳结束后进行湿转膜,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,体积分数5%脱脂奶粉37 ℃封闭2 h,洗膜后分别加入一抗:TGF-β_1(1∶100)、TGF-β_2(1∶1000)、Smad3(1∶1000)、p-Smad3(1∶1000)、β-Tubulin(1∶1000),4 ℃过夜后洗膜。分别加入辣根过氧化物酶标记的1∶400稀释的二抗,室温下孵育2 h,1×TBST洗膜8 min×5次。进行ECL化学发光显色,各组以β-tubulin作为内参。用美国伯乐凝胶图像分析系统扫描蛋白条带的光密度(OD)值,以目的蛋白与内参的比值作为目的蛋白的表达强度。

1.3 统计学处理 所有数据均采用SPSS 19.0统计软件分析,数据均以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法,计数资料采用频数表示,组间比较采用χ^2检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组血清中TGF-β_1和TGF-β_2分泌量 4组TGF-β_1和TGF-β_2分泌量整体比较差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,NDR组、NPDR组、PDR组TGF-β_1和TGF-β_2分泌量均显著增加(均为$P<0.01$),与NDR组比较,NPDR组、PDR组TGF-β_1和TGF-β_2分泌量均显著增加(均为$P<0.01$),其中,PDR组TGF-β_1和TGF-β_2分泌量均显著高于NPDR组(均为$P<0.01$;见表1)。

表1 4组血清中TGF-β_1和TGF-β_2分泌量比较 ($\bar{x}\pm s$,ρ/μg·L^{-1})

指标	对照组	NDR组	NPDR组	PDR组	F	P
TGF-β_1	54.7±9.7	59.2±7.8*	64.7±11.2*#	70.2±12.2*#△	6.781	0.002
TGF-β_2	60.3±11.8	64.2±9.8*	69.2±12.1*#	76.3±13.1*#△	7.227	0.001

注:与对照组比较,*$P<0.01$;与NDR组比较,#$P<0.01$;与NPDR组比较,△$P<0.01$

2.2 4组 TGF-β_1 和 TGF-β_2 蛋白表达量 4组TGF-β_1和TGF-β_2蛋白表达量整体比较差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,NDR组、NPDR组、PDR组TGF-β_1和TGF-β_2蛋白表达量均显著增加(均为$P<0.01$),与NDR组比较,NPDR组、PDR组TGF-β_1和TGF-β_2蛋白表达量均显著增加(均为$P<0.01$),其中,PDR组TGF-β_1和TGF-β_2蛋白表达量显著高于NPDR组(均为$P<0.01$;见表2,图1)。

2.3 4组 p-Smad3 蛋白表达量 4组p-Smad3蛋白表达量整体比较差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,NDR组、NPDR组、PDR组p-Smad3蛋白表达量均显著增加(均为$P<0.01$),与NDR组比较,NPDR组、PDR组p-Smad3蛋白表达量均显著增加(均为$P<0.01$),其中,PDR组p-Smad3蛋白表达量均显著高于NPDR组(均为$P<0.01$;见表2,图2)。

表2 4组血清中 TGF-β_1 和 TGF-β_2 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组	NDR组	NPDR组	PDR组	F	P
TGF-β_1	$(29.7\pm0.4)\times10^{-2}$	$(36.1\pm1.7)\times10^{-2}$*	$(47.2\pm2.6)\times10^{-2}$*#	$(99.8\pm1.4)\times10^{-2}$*#△	19.230	<0.001
TGF-β_2	$(28.6\pm0.3)\times10^{-2}$	$(35.6\pm1.2)\times10^{-2}$*	$(44.8\pm3.5)\times10^{-2}$*#	$(98.2\pm1.9)\times10^{-2}$*#△	22.219	<0.001
p-Smad3	$(12.1\pm0.3)\times10^{-4}$	$(17.2\pm3.7)\times10^{-4}$*	$(29.4\pm0.3)\times10^{-3}$*#	$(32.2\pm0.4)\times10^{-3}$*#	8.172	<0.001

注:与对照组比较,*$P<0.01$;与NDR组比较,#$P<0.01$;与NPDR组比较,△$P<0.01$

图1 4组血清中TGF-β_1和TGF-β_2蛋白表达。A:对照组;B:NDR组;C:NPDR组;D:PDR组

图2 4组血清中Smad3和p-Smad3蛋白表达。A:对照组;B:NDR组;C:NPDR组;D:PDR组

3 讨论

2010年,我国糖尿病患者已达9240万,尤以PDR对视力损伤更为严重。最近有研究报道糖尿病控制不佳的患者,病史5 a和10 a的PDR患病率可高达14.9%和28.5%[4]。PDR是糖尿病最严重的微血管并发症,其发病机制极其复杂,病理学研究显示与组织缺血缺氧、炎症反应、细胞增殖异常和纤维化有关。近年来,TGF-β与PDR的关系日益受到关注,在PDR的病理过程中发挥重要的作用。

TGF-β是一个包含众多成员的多功能细胞因子的大家族,主要调节细胞的生长、增殖、分化、迁移和凋亡等过程,可能是促进器官组织纤维化最直接的细胞因子。糖尿病患者体内长期的高血糖环境使视网膜组织内皮细胞和巨噬细胞分泌TGF-β异常增加,促进了血管生成和细胞增殖。有研究表明[5],TGF-β是一种具有多功能的生长因子,在肿瘤进展后期,通过诱导表皮-间叶转化促进肿瘤转移[6-7]。

本研究发现,DR患者血清中TGF-β_1和TGF-β_2分泌和表达及下游Smad的蛋白变化。结果发现DR患者TGF-β_1和TGF-β_2的分泌和蛋白水平明显高于对照组,特别是PDR组,提示高血糖状态下血清合成和分泌的TGF-β_1和TGF-β_2增加。考虑为糖尿病患者体内微循环障碍使组织长期处于缺氧状态,从而使血液中血小板和巨噬细胞活化,导致TGF-β的大量释放。当发生PDR时由于血液中增加的TGF-β刺激视网膜色素细胞、成纤维细胞和神经胶质细胞等迁移到玻璃体和视网膜下,促进PDR的发生。同时由于视网膜新生血管易破裂、渗漏特性使血液中的血小板和巨噬细胞进入玻璃体和视网膜中,导致TGF-β的大量释放形成恶性循环最终导致并加速PDR的形成和发展[8]。MANDRIOTA等[9]通过实验也发现TGF-β可以调节细胞的增殖和分化,并且随剂量增高作用越明显。同样ZORENA等[10]发现糖尿病儿童NPDR患者的血清TGF-β水平明显高于对照组,与本研究结果相似。同时深入研究TGF-β下游的信号分子Smad3的蛋白水平,结果发现,DR组的p-Smad3水平高于对照组,NPDR和PDR两组明显增高,并且与DR病变程度的严重程度密切相关,PDR患者中TGF-β和p-Smad3水平明显高于NPDR组。在高糖(18 mmol·L^{-1})培养的视网膜色素上皮细胞培养基中使用Smad3和TGF-β的抑制剂预处理细胞后,p-Smad3的表达明显减少,说明高糖环境下TGF-β介导的Smad信号通路参与了此过程[8]。这与我们的研究结果一致。

总之,本研究发现DR患者TGF-β和p-Smad3的表达增高,特别是在PDR患者中明显。说明由TGF-β介导的经典的信号通路参与了DR的发生和发展,在PDR的形成中发挥重要作用,进而阐明了PDR的分子机制,但是否非经典的其他信号通路也

引文格式:刘志强,苑志峰. 频域光相干断层扫描在早期视网膜周边裂孔中诊断的应用[J]. 眼科新进展,2016,36(10):960-962. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0257

【应用研究】

频域光相干断层扫描在早期视网膜周边裂孔中诊断的应用

刘志强 苑志峰

作者简介:刘志强,男,1972年10月出生,河北邢台人,硕士研究生,副主任医师。主要研究方向为眼底病的影像诊断及激光治疗。联系电话:13503280806;E-mail:lzq219199@163.com;ORCID:0000-0002-0677-8097

About LIU Zhi-Qiang: Male, born in October, 1972. Master degree. Tel: 13503280806; E-mail: lzq219199@163.com; ORCID: 0000-0002-0677-8097

收稿日期:2016-02-10
修回日期:2016-06-20
本文编辑:付中静
作者单位:054000 河北省邢台市,河北省眼科医院,河北省眼科学重点实验室,河北省眼病治疗中心
Received date: Feb 10, 2016
Accepted date: Jun 20, 2016
From the *Hebei Eye Hospital*, *Hebei Key Laboratory of Ophthalmology*, *Hebei Eye Disease Treatment Center*, *Xingtai* 054000, *Hebei Province*, *China*

Diagnostic application of optical coherence tomography in early peripheral retinal holes

LIU Zhi-Qiang, YUAN Zhi-Feng

【Key words】 optical coherence tomography; peripheral retinal hole; tractional retinal detachment

【Abstract】 **Objective** To investigate the clinical values of optical coherence tomography (OCT) in the early diagnosis of peripheral retinal holes. **Methods** Twenty-six eyes in 26 cases in our hospital with peripheral retinal holes that were early diagnosed by OCT were analyzed retrospectively. The position of suspected peripheral retinal holes of all patients were examined by slit lamp ophthalmoscope, trihedral reflector or indirect ophthalmoscope though dilated pupil and then checked by OCT. The diagnostic specificity and accuracy of OCT in early peripheral retinal holes were evaluated. **Results** OCT showed tractional holes in 13 eyes from the 26 eyes. Among 13 eyes, 9 cases showed tractional cord connected with one side of the holes, and 4 eyes showed the lid of the hole had totally separated from the top edge. 7 eyes demonstrated dry holes. 6 eyes showed peripheral retinal holes with partial retinal detachment. Among 6 eyes, 4 eyes showed tractional retinal detachment and 2 eyes with partial retinal detachment showed no tractional structure. **Conclusion** OCT has important meanings in early diagnosis of peripheral retinal holes, assess of the hole, and clinical treatment.

【中图分类号】 R774.1
【关键词】 光学相干断层扫描;视网膜周边裂孔;牵拉性视网膜脱离

【摘要】 **目的** 探讨频域光相干断层扫描(optical coherence tomography,OCT)在早期诊断周边视网膜裂孔中的临床应用价值。**方法** 对我院26例(26眼)经OCT完全确诊为早期周边视网膜裂孔的26例患者资料进行回顾性分析,均为单眼发生,所有患者OCT检查前均经散瞳后前置镜、三面镜或双目检眼镜检查,对周边疑似裂孔的位置进行画图、定位,然后采用OCT进行检查,观察OCT对早期视网膜周边裂孔诊断的特异性、准确性。**结果** 26眼患者中13眼OCT提示为牵拉性裂孔,其中9眼显示牵拉条索与裂孔的一端相连,4眼显示孔的盖已经完全脱离于孔的上缘;7眼OCT提示为干性裂孔;6眼OCT提示视网膜周边裂孔并伴有局限性视网膜脱离,4眼提示为牵拉性视网膜脱离,2眼裂孔周围视网膜局限性脱离,未发现牵拉组织形成。**结论** OCT在早期视网膜周边裂孔的诊断、判断裂孔的性质、指导临床治疗方面具有重要意义。

参与此过程尚未明确,需进一步的研究来证实。

参考文献

[1] 邹海东,张晢,许迅,王伟伟,李桂平,俞虹. 上海市北新泾街道老年人低视力和盲的流行病学调查[J]. 中华眼科杂志,2002,38(12):744-746.
[2] 叶健华,林晓峰,马承红,周斌兵,林文雄,钟亮尹,等. 转化生长因子β1在非增殖型糖尿病视网膜病变中的变化[J]. 眼科学报,2006,22(1):14-16.
[3] SAIKA S, YAMANAKA O, OKADA Y, TANAKA S, MIYAMOTO T, SUMIOKA T, *et al*. TGF-beta in fibroproliferative diseases in the eye[J]. *Front Biosci*(*Schol Ed*),2009,1:376-390.
[4] 林淑玲,陈祥彪. 2型糖尿病患者视网膜病变长期随访观察[J]. 中华眼底病杂志,2006,22(1):49-50.
[5] 刘镕,赵琴平,董惠芬,蒋明森. TGF-β信号传导通路及其生物学功能[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(1):77-83.
[6] Tian F, DACOSTA BYFIELD S, PARKS WT, YOO S, FELICI A, TANG B, *et al* Reduction in Smad2/3 signaling enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines[J]. *Cancer Res*,2003,63(23):8284-8292.
[7] ROBERTS AB, WAKEFIELD LM. The two faces of transforming growth factor-beta in carcinogenesis[J]. *PNAS*,2003,100(15):8621-8623.
[8] GRIGSGY J, BETTS B, VIDRO-KOTCHAN E, CULBERT R, TSIN A. A possible role of acrolein in diabetic retinopathy: involvement of a VEGF/TGF-βsignaling pathway of the retinal pigment epithelium in hyperglycemia[J]. *Curr Eye Res*,2012,37(11):1045-1053.
[9] MANDRIOTA SJ, MENOUD PA, PEPPER MS. Tranforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelia growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cell[J]. *J Biol Chem*,1996,271(19):11500-11505.
[10] ZORENA K, MALINOWSKA E, RACZYЙSKA D, MYSLIWIEC M, RACZYЙSKA K. Serum concentrations of transforming growth factor-Beta 1 in predicting the occurrence of diabetic retinopathy in juvenile patients with type 1 diabetes mellitus[J]. *J Diabetes Res*,2013,2013:310-319.