

【应用研究】

孙瑶 吕红彬 周琦 陈娟 何跃 欧阳科 石彦婷 李晗

眼,其中,PDR组49例49眼,对照组(非糖尿病性全层黄斑裂孔或黄斑裂孔性视网膜脱离患者)20例20眼。酶联免疫吸附试验定量检测两组患者血清及玻璃体标本中ANGPTL4表达水平。使用SPSS 17.0统计学软件对数据进行统计学分析。**结果** PDR组患者血清中ANGPTL4的表达水平(30.761 ± 2.996) ng · mL⁻¹较对照组患者(35.912 ± 1.763) ng · mL⁻¹低,差异有统计学意义($t = -8.851, P = 0.000$);玻璃体ANGPTL4的表达水平(14.723 ± 1.324) ng · mL⁻¹较对照组患者(7.892 ± 0.812) ng · mL⁻¹高,差异有统计学意义($t = 24.642, P = 0.000$)。两组患者血清中ANGPTL4表达水平均高于其玻璃体,且PDR组患者血清与玻璃体中ANGPTL4变化呈正相关关系($r = 0.884, P = 0.000$);对照组患者血清与玻璃体中ANGPTL4变化亦呈正相关关系($r = 0.881, P = 0.000$)。PDR组患者血清及玻璃体中ANGPTL4表达水平均与甘油三酯呈正相关,与高密度脂蛋白呈负相关关系(均为 $P < 0.05$),与其他临床指标无明显相关关系。术前玻璃体内注射雷珠单抗与不注射PDR患者血清及玻璃体中ANGPTL4表达水平,差异均无统计学意义(均为 $P < 0.05$)。**结论** PDR患者血清中ANGPTL4表达水平低于非糖尿病患者,其可能在糖尿病患者糖脂代谢的病理生理过程中发挥了一定的作用;PDR患者玻璃体中ANGPTL4表达水平高于非糖尿病患者,其可能参与了PDR的发生发展过程,针对PDR患者玻璃体中ANGPTL4的高表达进

行干预可能为未来 PDR 患者的治疗提供新的思路。

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,其主要病理改变为视网膜出血、渗出、微血管扩张及新生血管形成,是成人致盲的一大重要因素^[1]。DR 发病的确切机制尚不明了。临床上常根据散瞳下眼底所见将 DR 分为非增生型 DR 和增生型 DR(proliferative diabetic retinopathy, PDR), PDR 主要表现为新生血管形成、视网膜前出血或玻璃体积血。近年来研究发现,血管生成素样蛋白 4(angiotensin-like 4, ANGPTL4)作为一种新发现的分泌型糖蛋白,在肾实质细胞肿瘤缺血区域内血管内皮细胞中呈高表达,与缺氧程度密切相关,表明其参与了缺氧状态下新生血管的形成^[2]。为了探索 ANGPTL4 是否在 PDR 中发挥作用,本研究通过定量检测 PDR 患者血清和玻璃体中 ANGPTL4 的表达水平并进行分析,探讨 ANGPTL4 在 PDR 发生发展过程中可能的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料与分组 选取 2013 年 7 月至 2014 年 12 月于西南医科大学附属医院行经睫状体平坦部 20G 标准三通道玻璃体切割术的患者共 69 例 69 眼。所有患者均无自身免疫性疾病、肝脏损害、精神性疾病、肺部疾病和恶性肿瘤等。其中, PDR 组 49 例 49 眼, 平均年龄 53.49 岁, 平均糖尿病病程 9.29 a, 男 17 例, 女 32 例, 玻璃体积血 14 眼, 玻璃体积血同时伴牵拉性视网膜脱离 30 眼, 不伴玻璃体积血的牵拉性视网膜脱离 5 眼。为减少玻璃体切割术中出血、缩短手术时长, 遵照患者意愿, 部分患者选择玻璃体切割术前 3~7 d 行雷珠单抗玻璃体腔注射, 注药患者 8 例, 未注药患者 41 例; 对照组 20 例 20 眼, 均为非糖尿病患者, 平均年龄 57.95 岁, 男 7 例, 女 13 例, 全层黄斑裂孔 16 眼, 黄斑裂孔性视网膜脱离 4 眼。获取标本前取得患者及家属同意。所有血清和玻璃体标本均已通过我院伦理审查委员会的审查与同意。

1.2 主要仪器与试剂 YZ6E 检眼镜、Aviso 超声机、VX-10 Li 眼底照相分析仪、光学相光断层成像扫描仪、-80℃超低温冰箱、手术显微镜、LDZ5-2 离心机、高速离心机、微量移液器、酶标仪、ANGPTL4 ELISA 试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 生化指标检测 抽取全部患者空腹静脉血, 由我院检验科检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、尿酸(UA)、肌酐(Cre)、空腹静脉血糖(FBG)以及 PDR 组患者的糖化血红蛋白 A1c(HbA1c)等。

1.3.2 血及玻璃体 ANGPTL4 的采集、保存及检测 抽取空腹静脉血在 4℃条件下以 3000 r·min⁻¹离

心 10 min, 取上清液并分装冻存于 -80℃冰箱备测; 在玻璃体切割术开始后灌注开始前, 切割并收集 0.6~1.0 mL 未被灌注液稀释的中央部玻璃体, 在 4℃条件下以 15 000 r·min⁻¹离心 5 min, 取上清液分装后冻存于 -80℃冰箱备测。酶联免疫吸附试验测定血清及玻璃体标本中 ANGPTL4 含量。

1.4 统计学处理 通过 SPSS 17.0 统计学软件进行统计学处理, 所有数据进行正态性检验, 均符合正态分布, 用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。同组内的比较采用配对样本 *t* 检验, 组间均数的差异用方差分析; 两组间样本的构成比采用 χ^2 检验。两数据相关性采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PDR 组及对照组临床指标的比较 PDR 组患者年龄、性别、BMI、眼压、TC、TG、HDL-C、LDL-C 等指标与对照组比较差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$), 具有可比性。PDR 组患者 FBG、Cre 和 UA 的水平均高于对照组, 差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。

2.2 两组患者血清与玻璃体中 ANGPTL4 表达水平的比较 PDR 组患者血清中 ANGPTL4 的表达水平(30.761 ± 2.996) ng·mL⁻¹较对照组患者(35.912 ± 1.763) ng·mL⁻¹低, 差异有统计学意义($t = -8.851, P = 0.000$); 玻璃体 ANGPTL4 的表达水平(14.723 ± 1.324) ng·mL⁻¹较对照组患者(7.892 ± 0.812) ng·mL⁻¹高, 差异有统计学意义($t = 24.642, P = 0.000$)。两组患者血清中 ANGPTL4 表达水平均高于其玻璃体, 且 PDR 组患者血清与玻璃体中 ANGPTL4 变化呈正相关关系($r = 0.884, P = 0.000$); 对照组患者血清与玻璃体中 ANGPTL4 变化亦呈正相关关系($r = 0.881, P = 0.000$)。

2.3 PDR 组患者血清及玻璃体中 ANGPTL4 表达水平与各临床指标的相关性分析 PDR 组患者血清及玻璃体中 ANGPTL4 表达水平均与 TG 呈正相关, 与 HDL-C 呈负相关(均为 $P < 0.05$), 而与其他临床指标无明显相关关系(表 1)。

2.4 术前用药对 ANGPTL4 表达的影响 以术前是否行玻璃体腔雷珠单抗注射将 PDR 组患者分组比较两组患者血清及玻璃体中 ANGPTL4 表达水平, 差异均无统计学意义(均为 $P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

血管生成素样蛋白是一个与血管生成素结构类似的蛋白质家族。ANGPTL4 作为家族中的一员, 参与了糖脂代谢、血管生成、肿瘤生长转移以及细胞凋亡等过程^[3]。动物实验表明 ANGPTL4 可降低糖尿

表 1 PDR 组患者血清及玻璃体中 ANGPTL4 表达水平与各临床指标的相关性分析

指标	血清		玻璃体	
	r 值	P 值	r 值	P 值
年龄	0.107	0.462	-0.041	0.778
糖尿病病程	0.053	0.720	0.088	0.549
HbA1c	0.022	0.881	0.079	0.588
TC	-0.064	0.661	-0.075	0.607
TG	0.735	0.000	0.652	0.000
HDL-C	-0.597	0.000	-0.581	0.000
LDL-C	-0.170	0.244	-0.178	0.220
Cre	0.007	0.959	-0.115	0.433
UA	0.128	0.381	0.099	0.497
FBG	0.137	0.347	0.058	0.690

表 2 玻璃体腔注射雷珠单抗对 PDR 组患者血清及玻璃体中 ANGPTL4 表达的影响 (p/ng · mL⁻¹)

组别	n	血清 ANGPTL4	玻璃体 ANGPTL4
未用药组	41	30.322 ± 2.912	14.053 ± 1.465
用药组	8	31.001 ± 2.202	14.750 ± 0.463
P 值		0.091	0.057

病小鼠的血糖水平并改善其机体葡萄糖耐受能力^[4];而人体试验发现通过高胰岛素钳夹升高胰岛素水平可降低血清中 ANGPTL4 的表达^[5]。刘云涛等^[6]的研究也发现 2 型糖尿病患者血清中 ANGPTL4 的表达水平明显低于健康人群。这与本研究中 PDR 组患者血清中 ANGPTL4 的水平低于对照组结果一致。

目前人们普遍认为 DR 的发展主要与视网膜局部新生血管的促-抗平衡失调有关。许多血管相关因子如血管内皮生长因子、血管生成素、胰岛素样生长因子和色素上皮衍生因子等通过激活体内一系列细胞信号转导通路影响新生血管形成^[7-8],在 DR 的发生发展中起了重要作用,但是具体的机制仍不明确。YOKOUCHI 等^[9]通过体外细胞培养发现在高糖环境下视网膜色素上皮细胞中 ANGPTL4 表达增加,且表现出促血管生成作用,本研究也发现 PDR 组患者玻璃体中 ANGPTL4 的表达明显高于对照组,这与 YOKOUCHI 等研究结果基本一致,提示 ANGPTL4 可能对 PDR 的发生发展起了一定作用。其机制可能与 ANGPTL4 激活整合素 $\alpha_5\beta_1$ 介导的 Rac1/PAK 信号通路,减弱细胞与细胞间的联系,破坏了血管内皮细胞的屏障功能有关^[10]。ANGPTL4 由视网膜色素上皮细胞、血管内皮细胞和 Müller 细胞分泌产生。高糖情况下视网膜色素上皮细胞诱导 ANGPTL4 表达增加的机制尚不清楚,可能涉及多条通路,其中缺氧诱导转录因子 1 α 为一个重要因素。在缺氧的 Müller 细胞内,ANGPTL4 依赖缺氧诱导因子 1 α 的调节表达于视网膜内层,促进缺血性视网膜病变血管的通透性增加,这种作用会随缺氧程度的增加而逐渐增强^[11]。

雷珠单抗作为目前临床应用较为广泛的抗 VEGF 制剂,在治疗湿性年龄相关性黄斑变性以及缺

血性视网膜病变等疾病方面有重要的价值^[12]。本研究结果显示 PDR 组患者血清及玻璃体中 ANGPTL4 的水平不受术前是否行玻璃体腔雷珠单抗注射影响,这可能与 ANGPTL4 与 VEGF 在促新生血管形成过程中作用通路不同有关。BABAPOOR-FARROKHAN 等^[13]研究发现在缺血的 Müller 细胞中 ANGPTL4 不依赖 VEGF 的水平升高而表达上调,LU 等^[14]的研究却表明 PDR 患者玻璃体中 ANGPTL4 表达水平明显升高,且与 VEGF 水平直接相关,研究结果不完全一致,可能与样本量均偏小有关。

大量研究显示 ANGPTL4 作为一种潜在的脂蛋白脂肪酶抑制剂,可以抑制非必需脂肪酸的释放以及摄取,参与抑制富含 TG 的脂蛋白清除过程,而 TG 清除能力的削弱使得血和肝脏 TG 提高^[15]。本研究也发现,PDR 组患者血清中 ANGPTL4 浓度与 TG 呈正相关关系,与 HDL-C 呈负相关关系。

参考文献

[1] NENTWICH MM,ULBIG MW. Diabetic retinopathy-ocular complications of diabetes mellitus[J]. *World J Diabetes*,2015,6(3):489-499.

[2] LE JAN S,AMY C,CAZES A,MONNOT C,LAMANDE N,FAVIER J,et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma[J]. *Am J Pathol*,2003,162(5):1521-1528.

[3] SANTULLI G. Angiopoietin-like proteins;a comprehensive look[J]. *Front Endocrinol*,2014,5:4.

[4] XU A,LAM MC,CHAN KW,WANG Y,ZHANG J,HOO RL,et al. Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005,102(17):6086-6091.

[5] VAN RAALTE DH,BRANDS M,SERLIE MJ,MUDDE K,STIENSTRA R,SAUERWEIN HP,et al. Angiopoietin-like protein 4 is differentially regulated by glucocorticoids and insulin in vitro and in vivo in healthy humans[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*,2012,120(10):598-603.

[6] 刘云涛,蒯磊,潘敬芳. 早期糖尿病慢性肾脏疾病患者血清血管生成素样蛋白 4 水平及吡格列酮影响的观察[J]. *中国糖尿病杂志*,2015,23(4):135-139.

[7] LIU YT,JIAN L,PAN JF. The serum ANGPTL4 level in patients with early chronic kidney disease in diabetes and the influence of pioglitazone on the level[J]. *Chin J Diabetes*,2015,23(4):135-139.

[8] CILENSEK I,MANKOC S,GLOBOCNIK PETROVIC M,PETROVIC D. The 4 a/4 a genotype of the VNTR polymorphism for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene predicts risk for proliferative diabetic retinopathy in Slovenian patients (Caucasians) with type 2 diabetes mellitus[J]. *Mol Biol Rep*,2012,39(6):7061-7067.

[9] SANG DN,D' AMORE PA. Is blockade of vascular endothelial growth factor beneficial for all types of diabetic retinopathy[J]? *Diabetologia*,2008,51(9):1570-1573.

[10] YOKOUCHI H,ETO K,NISHIMURA W,TAKEDA N,KABURAGI Y,YAMAMOTO S,et al. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is induced by high glucose in retinal pigment epithelial cells and exhibits potent angiogenic activity on retinal endothelial cells[J]. *Acta Ophthalmol*,2013,91(4):e289-e297.

[11] HUANG RL,TEO Z,CHONG HC,ZHU P,TAN CK,LAM CR,et al. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters[J]. *Blood*,2011,118(14):3990-4002.

(下转第 68 页)

的患者,视力改善却不理想,有的视力甚至下降,促使人们进一步探究影响IMH患者视力预后的深层原因。IS/OS层的完整性,被认为是光感受器完整的重要标志,是评估患者视功能预后的重要指标^[12]。于是,本研究中我们观察并测量的DIOA,采用IS/OS连接线中断点间的最大值,是一个比较客观的可重复的指标。结果发现,术后平均DIOA较术前明显减小,且两者差异有统计学意义($t=1.18, P=0.001$)。由于光感受器内外节是将光信息转化成生物电信号后向中枢神经传递的重要一环,越来越多的研究显示IS/OS层结构变化与患者的视力预后密切相关。一些学者将IS/OS层分为连续、中断和缺失的不同形态,从而进行定性分析^[13],而本研究是测量IS/OS层水平方向缺失区域的长度,属定量分析。本研究结果显示,手术前后BCVA(logMAR)下降,IS/OS层DIOA也下降,两者明显正相关,这表明IS/OS层DIOA的大小与视力密切相关,因此可以作为预测术后视力恢复情况的一个关键指标。

本研究不仅从解剖结构上对裂孔愈合情况进行分类分析,并且从术后视力恢复情况对影响黄斑裂孔预后的相关因素进行分析,从而找出与视力恢复相关性最密切的因素,并且对之前研究者提出的各项指数加以证实,其意义在于能够在手术前预测术后愈合情况。但由于本研究样本量较小,且数据测量的准确度无法做到毫无偏差,另外,作为回顾性临床研究,本研究已经尽可能地延长随访时间,但仍存在随访期不一致等不足,有待进行进一步更完善的临床研究。

参考文献

[1] KELLYN E, WENDEL RT. Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study[J]. *Arch Ophthalmol*, 1991, 109(5): 654-659.
[2] MESTER V, KUHN F. Internal limiting membrane removal in the management of full-thickness macular holes [J]. *Am*

Ophthalmol, 2000, 32(4): 308-315.
[3] YOREH BARAK, MARK A, IHNEN, SCHAAL S. Spectral domain optical coherence tomography in the diagnosis and management of vitreoretinal interface pathologies[J]. *J Ophthalmol*, 2012, 2012(6): 876472.
[4] KIERNAN DF, MIELER WF, HARIPRASAD SM. Spectral-domain optical coherence tomography: a comparison of modern high-resolution retinal imaging systems [J]. *Am J Ophthalmol*, 2010, 149(1): 18-31.
[5] 刘佩佩, 赵明威, 董冲亚, 孙遥遥, 黎晓新, 姜燕荣, 等. 特发性黄斑裂孔玻璃体切割手术治疗裂孔解剖愈合的相关因素分析[J]. *中华眼底病杂志*, 2014, 30(4): 339-342.
LIU PP, ZHAO MW, DONG CY, SUN YY, LI XX, JIANG YR, et al. Associated factors analysis for predicting anatomical outcomes of idiopathic macular hole after vitrectomy[J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2014, 30(4): 339-342.
[6] VILLATE N, JI E L, VENKATRAMAN A, SMIDDY WE. Photoreceptor layer features in eyes with closed macular holes: Optical coherence tomography findings and correlation with visual outcomes[J]. *Am J Ophthalmol*, 2005, 139(2): 280-289.
[7] WAKELY L, RAHMAN R, STEPHENSON J. A comparison of several methods of macular hole measurement using optical coherence tomography, and their value in predicting anatomical and visual outcomes[J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(7): 1003-1007.
[8] IP MS, BAKER BJ, DUKER JS, REICHEL E, BAUMAL CR, GANGNON R, et al. Anatomical outcomes of surgery for idiopathic macular hole as determined by optical coherence tomography[J]. *Arch Ophthalmol*, 2002, 120(1): 29-35.
[9] STERAOKA K. Prediction of postoperative visual outcome based on hole configuration by optical coherence tomography in eyes with idiopathic macular holes [J]. *Am J Ophthalmol*, 2005, 138(5): 709-716.
[10] RUIZMORENO JM, STAICU C, PIÑERO DP, MONTERO J, LUGO F, AMAT P. Optical coherence tomography predictive factors for macular hole surgery outcome[J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92(5): 640-644.
[11] CHANG LK, KOIZUMI H, SPAIDE RF. Disruption of the photoreceptor inner segment-outer segment junction in eyes with macular holes[J]. *Retina*, 2008, 28(7): 969-975.
[12] LANDA G, SU E, GARCIA PM, SEIPLE WH, ROSEN RB. Inner segment-outer segment junctional layer integrity and corresponding retinal sensitivity in dry and wet forms of age-related macular degeneration[J]. *Retina*, 2011, 31(2): 364-70.
[13] INOUE M, WATANABE Y, ARAKAWA A, SATO S, KOBAYASHI S, KADONOSONO K. Spectral-domain optical coherence tomography images of inner/outer segment junctions and macular hole surgery outcomes[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 247(3): 325-330.

(上接第 51 页)

[11] XIN X, RODRIGUES M, UMAPATHI M, KASHIWABUCHI F, MA T, BABAPOOR-FARROKHRAN S, et al. Hypoxic retinal Muller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopoietin-like 4 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(36): E3425-E3434.
[12] BANDELLO F, CORVI F, LA SPINA C, BENATTI L, QUERQUES L, CAPUANO V, et al. Outcomes of intravitreal anti-VEGF therapy in eyes with both neovascular age-related macular degeneration and diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100(12): 1611-1616.
[13] BABAPOOR-FARROKHRAN S, JEE K, PUCHNER B, HASSAN

SJ, XIN X, RODRIGUES M, et al. Angiopoietin-like 4 is a potent angiogenic factor and a novel therapeutic target for patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(23): E3030-E3039.
[14] LU Q, ZOU W, CHEN B, ZOU C, ZHAO M, ZHENG Z. ANGPTL4 correlates with vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254(7): 1281-1288.
[15] MEHTA N, QAMAR A, QU L, QASIM AN, MEHTA NN, REILLY MP, et al. Differential association of plasma angiopoietin-like proteins 3 and 4 with lipid and metabolic traits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(5): 1057-1063.