

VEGF、IL-6 的水平与糖尿病视网膜病变关系的研究

Level of Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-6 in Aqueous Humor in Diabetic Retinopathy Patients

周 林 孙 昊 徐 岬 康建芳

徐州医学院附属淮安医院, 淮安 223002

Lin Zhou, Hao Sun, Jia Xu, Jianfang Kang

Huai'an Hospital of Xuzhou Medical College, Huai'an 223002, China

目的: 检测 2 型糖尿病患者眼房水中血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)的含量,并探讨其临床意义。

方法: 在白内障手术过程中获取 66 例 2 型糖尿病患者的房水,采用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法测定 VEGF 和 IL-6 的含量。根据手术后散瞳眼底检查和眼底荧光素血管造影检查确定糖尿病视网膜病变的分期。实验组分为:无糖尿病视网膜病变组(NDR)21 例、单纯型糖尿病性视网膜病变组(BDR)26 例、增生型糖尿病性视网膜病变组(PDR)19 例,正常对照组为健康的老年性白内障患者 20 例。

结果: NDR 组、BDR 组、PDR 组的房水 VEGF 含量分别为(240.30±26.15)pg/ml、(292.27±58.91)pg/ml、(477.41±91.01)pg/ml,IL-6 含量分别为 (160.83±33.41)pg/ml、(238.60±62.23)pg/ml、(389.13±90.35)pg/ml,对照组房水 VEGF 含量为(140.58±26.27)pg/ml、IL-6 含量为(82.72±21.53)pg/ml,对照组与实验组比较差异均有统计学意义($F=113.67, P<0.01$; $F=106.53, P<0.01$)。实验组房水中的 VEGF 与 IL-6 含量有相关性($r=0.995, P<0.01$);糖尿病患者的病程与房水中 VEGF($r=0.792, 0.826, 0.841$ 均 $P<0.01$)、IL-6($r=0.829, 0.817, 0.896$ 均 $P<0.01$)含量有相关性。

结论: VEGF、IL-6 在糖尿病视网膜病变的形成过程中有重要作用,且两者之间有相关性。眼科学报 2010; 25: 26-30.

关键词: 血管内皮生长因子;白细胞介素-6;糖尿病视网膜病变

Purpose: To explore the role of vascular endothelial growth factor(VEGF) and interleukin-6(IL-6) in the aqueous humor in the pathogenesis of diabetic retinopathy (DR).

Methods: Aqueous humor samples were collected in type 2 diabetic patients during cataract surgery. The classification of DR was assigned based on the fundus examination and fluorescein angiography after cataract surgery. The experiment group included non-diabetic retinopathy (NDR, 21 cases), background diabetic retinopathy (BDR, 26 cases) and Proliferative diabetic retinopathy (PDR, 19 cases). The control group was the healthy cataract patients (20 cases). The levels of VEGF and IL-6 in the aqueous humor was assessed using the ELISA technique.

Results: The level of VEGF in NDR, BDR and PDR cases were(240.30±26.15)pg/

ml, (292.27±58.91)pg/ml and (477.41±91.01)pg/ml, respectively. The level of IL-6 in NDR, BDR and PDR cases were (160.83±33.41)pg/ml, (238.60±62.23)pg/ml and (389.13±90.35)pg/ml, respectively. The levels of VEGF and IL-6 in the aqueous humour from the control group were (140.58±26.27) pg/ml, (82.72±21.53)pg/ml. The level of VEGF and IL-6 were significantly different in experiment and control groups ($F=113.67, P<0.01; F=106.53, P<0.01$). In the aqueous humor of diabetic patients increased significantly ($P<0.1$). The level of VEGF and IL-6 was significantly correlated with each other in experiment group ($r=0.995, P<0.01$). The levels of VEGF ($r=0.792, 0.826, 0.841, P<0.01$) and IL-6 ($r=0.829, 0.817, 0.896, P<0.01$) were also significantly correlated with the duration of DR.

Conclusion: VEGF and IL-6 play important roles in the development of DR. The levels of these two factors are correlated with each other in DR patients. *Eye Science* 2010; 25: 26-30

Key words: Vascular endothelial growth factor; Interleukin-6; Diabetic retinopathy

糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见和严重的并发症之一,也是目前主要致盲原因之一。长期以来,学者们对DR的发病机理进行了大量研究,目前认为,DR在病理学上属于一种细胞增殖性疾病,因此其发生、发展必然与细胞增殖的调控失常有关,细胞因子在细胞增殖的调控中起重要作用,它们可能参与了视网膜增殖病变的发生、发展过程。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知最强的内皮细胞选择性促有丝分裂因子和血管生成因子,能特异性的刺激血管内皮细胞增殖,参与新生血管的形成过程,被认为是与DR新生血管形成联系最紧密的一个细胞因子。除此外,其它细胞因子可能也在DR的病理过程中起着重要作用,白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)属于炎症前细胞因子(Proinflammatory cytokine),是活化的T细胞、单核巨噬细胞、纤维母细胞及某些肿瘤细胞所分泌的一种蛋白分子,是感染或外伤急性期反应的主要诱导因子。Yuuki等^[1]研究表明IL-6在DR的病理过程中起重要作用。本研究测定糖尿病患者房水中VEGF、IL-6的含量,以探讨两者与DR发生、发展的关系。

对象和方法

一、研究对象

研究对象来自我院眼科2009年2月至2010年2月行白内障超声乳化手术患者。对照组20

例,为健康老年性白内障患者,无其它眼部疾病史。实验组66例,均确诊为2型糖尿病的患者,术前血糖均控制在8.3 mmol/L以下,无其它眼部疾病史。根据患者术后眼底检查及眼底荧光血管造影结果,按照1987年中华医学会糖尿病性视网膜病变分期标准,将实验组分为无糖尿病性视网膜病变组(Diabetic patients without retinopathy, NDR),单纯型糖尿病性视网膜病变组(Background diabetic retinopathy, BDR),增生性糖尿病视网膜病变组(Proiferative diabetic retinopathy, PDR)3组。

二、方法

1. 房水取样方法:开睑后,以0.5 g/L碘伏稀释液消毒结膜囊,无菌生理盐水反复冲洗,无菌纱布吸尽结膜囊中积液,以无菌1 ml一次性塑料TB针管接9号针头,于角膜缘内1 mm前房穿刺,在2~5 s内从中央瞳孔区抽吸,不触及虹膜,晶状体及角膜内皮细胞,采集房水约0.2 ml,即移至已消毒并硅化的0.5 ml Eppendorf管,放入液氮中,然后存放于-70~80℃冰箱中待分析。

2. ELISA法检测VEGF和IL-6的含量:从冰箱中取出标本,置于室温下10 min待测。人VEGF、IL-6的ELISA试剂盒均购自深圳晶美生物工程有限公司(灵敏度为7 ng/L, 5 ng/L),测量仪器为Thermomuliskan MK3型酶标仪。根据试剂盒说明,将标准品用稀释液定比稀释,混合均匀。将酶标板各孔依次编号,然后在相应孔加入不同浓度标准品或标本100 μl,用封板胶纸封住反应孔,37℃孵

箱孵育 90 min,再用稀释好的洗涤液洗板 4 次,充分甩干。在各孔中加入生物素化抗体工作液 100 μ l,用封板胶纸封住反应孔,37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 60 min,洗板 4 次。每孔再加入酶结合物工作液 100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵箱孵育并封住板孔,37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 30 min。然后洗板 4 次,在每孔中加入显色剂 100 μ l,37 $^{\circ}$ C避光孵育 10~15 min 后,在每孔中加入终止液 100 μ l,混匀,酶标仪 450 nm 处读数,在 5 min 内测定各孔吸光度值(A 值),根据定比稀释标准品的 A 值绘制标准曲线,以算出标本中 VEGF 的含量(ng/L)。房水中 IL-6 的测定步骤和 VEGF 的相同。

三、统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件包。各组房水中的 VEGF 和 IL-6 的含量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对实验结果进行单因素方差分析和直线相关性分析。

结 果

一、一般结果

对照组 20 例(20 眼),男 8 例(8 眼),女 12 例(12 眼),年龄 49~71 岁,平均(57.5 \pm 8.2)岁。实验组 66 例(66 只眼),其中,NDR 组 21 例(21 眼),男 10 例(10 眼),女 11 例(11 眼),年龄 51~69 岁,平均(58.4 \pm 6.7)岁,糖尿病病程 2.6~7.8 年;BDR 组 26 例(26 眼),男 12 例(12 眼),女 14 例(14 眼),年龄 50~73 岁,平均(60.1 \pm 7.8)岁,糖尿病病程 5.5~10.8 年;PDR 组 19 例(19 眼),男 8 例(8 眼),女 11 例(11 眼),年龄 53~74 岁,平均(61.3 \pm 8.4)岁,糖尿病病程 9.3~20.4 年。

二、房水中 VEGF 和 IL-6 的含量

对照组和各试验组的 VEGF、IL-6 的均值见表 1,方差分析显示:实验组房水中 VEGF($F=113.67$, $P<0.01$)、IL-6($F=106.53$, $P<0.01$)含量与对照组比较差异有统计学意义。对照组、NDR 组、BDR 组、PDR 组 4 个组房水 VEGF、IL-6 含量有依次增加的趋势,实验组房水中的 VEGF 与 IL-6 含量有相关性($r=0.995$, $P<0.01$)。

三、糖尿病病程,眼底病变程度以及与房水中 VEGF、IL-6 含量的关系

由表 1 可见,NDR 组、BDR 组、PDR 组的病程逐渐增加,组间比较差异有统计学意义($F=113.67$, $P<0.01$)。NDR 组、BDR 组、PDR 组实验组的各组病程与房水中 VEGF($r=0.792$, 0.826, 0.841, 均 P

表 1 糖尿病患者病程、房水中 VEGF、IL-6 的含量

组别	例数	病程 (年)	VEGF (ng/L)	IL-6 (ng/L)
对照组	20		140.58 \pm 26.27	82.72 \pm 21.53
NDR	21	6.03 \pm 3.94	240.30 \pm 26.15	160.83 \pm 33.41
BDR	26	10.50 \pm 4.35	292.27 \pm 58.91	238.60 \pm 62.23
PDR	19	14.68 \pm 5.42	477.41 \pm 91.01	389.13 \pm 90.35

<0.01)、IL-6 含量相关($r=0.829$, 0.817, 0.896, 均 $P<0.01$)。

讨 论

糖尿病视网膜病变病理过程十分复杂,近年来的研究认为 DR 的发生与视网膜内各种生长因子和抑制因子的不平衡有关,进而导致细胞增殖及新生血管的形成。DR 患者的新生血管与许多生长因子有关,如血小板源性生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(TGF-B)、胰岛素样生长因子(IGF)等。其中 VEGF 是目前所知促新生血管作用最强、最直接的生长因子^[2]。VEGF 是 Ferrara 等在 1989 年从牛脑垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的二硫键结合的二聚体糖蛋白,因其促血管内皮细胞有丝分裂而得名,因其同时具有较强的血管渗透作用(比组织胺强 5 万倍),又称之为血管通透性因子,是目前所知的最强的、最具选择性的内皮细胞促有丝分裂因子和血管生成因子,通过与其受体结合参与多种生理和病理性新生血管形成过程。VEGF 特异性地与血管内皮细胞受体结合,通过增加血管的通透性,促进内皮细胞增殖^[3],增加内皮细胞对葡萄糖的转运^[4],改变细胞外基质^[5-6],上调细胞间粘附分子-1(ICAM-1)^[7]的基因表达等破坏血—视网膜屏障,视网膜血管通透性增高,视网膜水肿,促使视网膜局部缺血、缺氧加重,新生血管形成。

房水是一种包含多种生长因子的复合的生物活性液体,眼内组织产生的各种生长因子可通过多种途径进入前房^[8],房水中生长因子的浓度变化可在一定程度上反映它们在眼内组织的表达状况。本研究结果表明,实验组房水 VEGF 含量均比对照组高,差异有统计学意义,且 NDR 组、BDR 组、PDR 组的房水 VEGF 含量有明显增加的趋势,即房水中 VEGF 含量越高,DR 程度越重。

IL-6 是一种典型的具有多种生物学功能的细

胞因子,主要由单核-吞噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞产生;受糖皮质激素、雌激素和环孢霉素 A 的抑制;人免疫缺陷病毒也能诱导单核细胞产生 IL-6;IL-10 和 IL-13 能抑制单核细胞产生 IL-6;IL-6 也有自分泌和旁分泌效应^[9]。IL-6 主要生物学作用是促进 B 细胞增殖分化和分泌抗体;在 IL-2 存在下,IL-6 可促使成熟和未成熟 T 细胞分化为细胞毒 T 淋巴细胞;促进肝合成急性期蛋白;作为内源性致热原,参与炎症反应;对神经组织和造血系统具有广泛效应。

IL-6 是体内炎症反应和一系列病理生理过程的重要介素。在糖尿病视网膜病变条件下,由于高血糖所致的线粒体活性氧生成增多,内皮细胞和周细胞发生凋亡,同时 NO 扩张血管使得血流量增大,造成对内皮细胞的机械性损害,这使得视网膜微血管逐渐出现粘滞度增高。在活性氧诱导的白细胞介素(IL-1、IL-6)等作用,细胞黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)的表达上调,白细胞黏附使内皮细胞进一步受损。IL-6 可作为急性反应的始发因子,能影响 2 型糖尿病的发病,并通过与胰岛素的相互作用而影响 2 型糖尿病的发病。

孙纳等^[10]以胚胎胰岛研究证明,糖刺激可以明显促进胰岛细胞分泌白细胞介素-6,糖尿病患者普遍存在的高血糖可促进 IL-6 的生成。有报道^[11],大量的 IL-6 可对胰岛细胞产生直接的细胞毒作用,从而加速糖尿病的发生。糖尿病时血液中的高血糖可刺激血管内皮细胞和外周血单核细胞 IL-6 分泌,同时,IL-6 可促进 T、B 细胞过度激活和扩增,加速成细胞凋亡,促进胰岛 β 细胞的破坏^[12],加重糖尿病的病程。顾永辉等^[13]研究发现,2 型糖尿病患者体内存在较高的 IL-6,经降糖药物治疗控制血糖后,患者血清 IL-6 水平显著降低。

糖化蛋白终末产物是糖尿病性视网膜病变发生、发展的一个重要原因。近年研究发现,糖化蛋白终末产物可通过与多种细胞表面的 AGE 受体结合激活免疫细胞,刺激人外周血淋巴细胞分泌 IL-6^[14]糖尿病患者表现出的糖化蛋白终末产物诱导细胞因子分泌的高敏现象有可能是糖尿病并发症发生的一个因素。闫晓光等^[15]研究发现,糖尿病患者血清 IL-6 水平增高,随着糖尿病性视网膜病变程度的加重,IL-6 水平逐渐升高,提示其与糖尿病性视网膜病变,特别是增殖性糖尿病视网膜病变的发生、发展有关。有研究表明,IL-6 在玻璃体

内浓度升高与增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)的发病过程密切相关^[1]。

本研究结果表明,实验组房水中 IL-6 含量均比对照组高,NDR 组、BDR 组、PDR 组的房水 IL-6 含量有明显增加的趋势,随着糖尿病病程的延长,眼部病情的加重,房水中的 IL-6 含量是增高的,提示 IL-6 与 DR 的发生、发展有着密切的联系。

IL-6 是 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、单核细胞等分泌的多功能细胞因子,具有广泛的生物活性。有作者提出 IL-6 等细胞因子同样由低氧所诱导,与 VEGF 具有某些类似的特征,也可作为新生血管因子起作用^[16]。更重要的是,IL-6 可直接诱导 VEGF 的表达,这一效应通过 VEGF 基因启动子上特异性 DNA 序列及 5'-非翻译区(5'-UTR)的特异元件所介导。由此我们可以推测,在视网膜低氧条件下,局部微环境的改变诱导了 VEGF 和 IL-6 的产生,而 IL-6 又可促进 VEGF 的表达增加,两者共同作用导致视网膜新生血管生成^[17]。本研究结果亦表明,房水中 VEGF 的含量和 IL-6 的含量相关。

糖尿病患者房水中 VEGF、IL-6 含量均增加,提示在 DR 发生、发展的病理过程中,两者共同参与并相互影响,随着我们对 VEGF 和 IL-6 的深入研究,将有助于揭示视网膜新生血管性疾病的形成机制,从而找到更有效的防治途径。

参考文献

1. Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, et al. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy [J]. *Diabetes Complications*, 2001, 15(5):257-259.
2. 赵世红. 血管内皮生长因子及其受体与眼内新生血管性疾病[J]. *眼科研究*, 2003, 21(1):103-106.
3. 卢海,张惠荣. 生长因子诱导的血管内皮细胞增殖作用的研究[J]. *眼科研究*, 2001, 19(4):297-300.
4. Sone H, Deo BK, Kumagai AK. Enhancement of glucose transport by vascular endothelial growth factor in retinal endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(7):1876-1884.
5. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. *Endocr Res*, 1997, 18(4):4-25.
6. Spirin KS, Saghizadeh M, Lewin SL, et al. Basement membrane and growth factor gene expression in normal and diabetic human retinas [J]. *Curr Eye Res*, 1999, 18

- (6):490-499.
7. Lu M, Perez VL, Ma N, et al. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999,40(7):1808-1812.
 8. Funatsu H, Yamashita H, Noma H, et al. Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2005, 243(1):3-8.
 9. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998,83(3):847-850.
 10. 孙 纳,田志刚. 白细胞介素-6对胰岛分泌功能的生物学调节及免疫病理学意义 [J]. 中华内分泌代谢杂志,2000,16(2):132-133.
 11. Andre-Schmutz I, H indelang C, Benoist C, et al. Cellular and molecular changes accompanying the progression from insulinitis to diabetes [J]. Eur J Immunol, 1999,29(1):245-255.
 12. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study [J]. Diabetes, 2003,52(3):812-817.
 13. 顾永辉,刘 超,武晓泓,等. 血糖控制对初发2型糖尿病患者C-反应蛋白及白细胞介素-6水平的影响 [J]. 中国临床康复杂志,2006,10(44):64.
 14. Nishikawa T, Wdelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage[J]. Nature, 2000,404(6779):787.
 15. 闫晓光,孙予倩,赵 芮,等. 糖尿病性视网膜病变与血清肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素-6水平的关系 [J]. 中国临床康复杂志,2005,9(47):44.
 16. Naldini A, Carraro F, Silvestri S, et al. Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells [J]. J Cell Physiol, 1997, 173(3):335-342.
 17. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, et al. Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor [J]. J Biol Chem, 1996,271(2):736-741.
- (收稿日期:2010-03-09 编辑:杨江瑜)

(上接第18页)

4. 褚仁远,瞿小妹. 建立儿童屈光发育档案是预防近视的基础步骤 [J]. 中华眼科杂志,2009,45(7) 577-579.
 5. Edwards MH. The development of myopia in Hong Kong children between the ages of 7 and 12 years: a five-year longitudinal study [J]. Ophthalmic Physiol Opt, 1999,19(4):286-294.
 6. Chan OY, Edwards M. Comparison of cycloplegic and noncycloplegic retinoscopy in Chinese pre-school children [J]. Optom Vis Sci, 1994,71(5):312-318.
 7. Cordonnier M, Kallay O. Non-cycloplegic screening for refractive errors in children with the hand-held autorefractor Retinomax: final results and comparison with non-cycloplegic photoscreening [J]. Strabismus, 2001,9(2):59-70.
 8. Lin LL, Shih YF, Hsiao CK, et al. Epidemiologic study of the prevalence and severity of myopia among school children in Taiwan in 2000 [J]. J Formos Med Assoc, 2001,100(10):684-691.
 9. Curtin BJ. The myopias-basic science and clinical management [M]. Philadelphia: Harper & Row Publishers, 1985,3-59.
 10. 石一宁,何 萍,赵宏英,等. 西安市2003年度中学生动态眼屈光状况调查 [J]. 眼科学报,2005,21(4):131-136.
 11. 周子梅,戴锦晖,褚仁远,等. 握笔姿势对学龄儿童近视病情影响的初步研究 [J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2005,5(1):38-39.
- (收稿日期:2010-05-03 编辑:林燕薇)