

Aqueous Humor Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor and Oscillatory Potentials in Diabetic Retinopathy Patients

Jing Zang^{1*}, Guoqi Guan², Wenjuan Wang¹, Jionglin Bao¹, Lilun Chen¹

¹Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

²Jinan University, Guangzhou Guangdong

Email: *zang62@yahoo.com

Received: Mar. 2nd 2016; accepted: Mar. 25th, 2016; published: Mar. 29th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To investigate the relationship between pigment epithelium derived factor (PEDF) and oscillatory potentials (OPs) in various diabetic retinopathy and to provide an objective basis for the early diagnosis of diabetic retinopathy (diabetic retinopathy, DR) and the prediction of the progression of the disease. **Methods:** Aqueous humor samples were collected from 40 eyes of 40 type 2 diabetes patients, including 19 eyes without diabetic retinopathy and 21 eyes with diabetic (11 eyes with NPDR and 10 eyes with PDR), twenty aqueous samples from 20 cataract patients without other ocular or systemic diseases served as controls. The PEDF levels in aqueous humor were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The total amplitude of OPs in the whole retina was detected by the Roland visual electrophysiological test instrument of the German CONSULT ROLAND company. **Results:** The PEDF and OPs level in eyes without diabetic retinopathy [(9.13 ± 4.43) ng/ml, 164.56 ± 37.41) μV, P < 0.01] was significantly lower than that in controls [(13.87 ± 0.36) ng/ml, (237.96 ± 35.96) μV]; the PEDF level in eyes with NPDR [(7.00 ± 2.04) ng/ml, (79.80 ± 19.89) μV, P < 0.01] and PDR [(6.39 ± 1.66) ng/ml, (28.55 ± 17.47) μV, P < 0.01] was significantly lower than that in controls [(13.87 ± 0.36) ng/ml, (237.96 ± 35.96) μV]; the concentration of PEDF in the patients with type 2 diabetes mellitus was significantly lower than that in the NPDR and PDR group (P = 0.04, P = 0.02), while there was no significant difference between NPDR group and PDR group (P = 0.34). There were significant differences in different OPs group (P < 0.01). The PEDF concentration in the aqueous humor of the diabetic retinopathy was a typical positive correlation with the total amplitude of OPs (r = 0.905, P < 0.01). **Conclusion:** The concentration of PEDF in aqueous humor and the total amplitude of OPs were positively correlated with the diabetic retinopathy, which could provide an objective basis for the early diagnosis of diabetic retinopathy and the prediction of the progression of the disease.

*通讯作者。

Keywords

Diabetic Retinopathy, Pigment Epithelium Derived Factor, Oscillatory Potentials

各期糖尿病视网膜病变患者房水中PEDF与OPs的相关性分析

臧晶^{1*}, 管国奇², 王文娟¹, 鲍炯琳¹, 陈立伦¹

¹广东药学院附属第一医院, 广东 广州

²暨南大学, 广东 广州

Email: zang62@yahoo.com

收稿日期: 2016年3月2日; 录用日期: 2016年3月25日; 发布日期: 2016年3月29日

摘要

目的: 探讨房水中色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)与视网膜电图振荡电位(oscillatory potentials, OPs)在各期糖尿病性视网膜病变中的相关性研究分析, 为糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的早期诊断及病程进展预测提供客观的检测依据。方法: 房水来自2型糖尿病患者40例40眼。单纯2型糖尿病患者组19例19只眼, 非增殖期糖尿病性视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)组患者11例11只眼, 增殖期糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)组患者10例10只眼, 单纯老年性白内障患者20例20只眼作为对照组。用酶联免疫吸附法检测房水中PEDF的水平, 用德国 ROLAND CONSULT公司生产的罗兰视觉电生理检查仪检测全视网膜电图中OPs的总振幅值。结果: 单纯2型糖尿病患者组、NPDR组及PDR组的房水中PEDF的浓度分别为(9.13 ± 4.43) ng/ml、(7.00 ± 2.04) ng/ml、(6.39 ± 1.66) ng/ml与对照组(13.87 ± 0.36) ng/ml相比, 房水中PEDF浓度均明显降低(P < 0.01), 单纯2型糖尿病患者组与NPDR组及PDR组相比, 房水中PEDF浓度亦均明显降低(P = 0.04, P = 0.02), 而NPDR组与PDR组相比无明显差异(P = 0.34); 单纯2型糖尿病患者组、NPDR组及PDR组的OPs的总振幅值分别为(164.56 ± 37.41) μV、(79.80 ± 19.89) μV、(28.55 ± 17.47) μV与对照组(237.96 ± 35.96) μV相比, OPs的总振幅值均明显降低(P < 0.01), 而且组间两两比较亦有明显差异(P < 0.01); 各期糖尿病性视网膜病变房水中PEDF浓度变化与OPs的总振幅值呈典型的正相关(r = 0.905, P < 0.01)。结论: 房水中PEDF的浓度与OPs总波幅在各期糖尿病性视网膜病变中呈正相关, 可为糖尿病视网膜病变的早期诊断及病程进展预测提供客观的检测依据。

关键词

糖尿病视网膜病变, PEDF, OPs

1. 引言

糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)是目前糖尿病最常见和严重的并发症之一, 已成为世界性的主要致盲性眼病之一[1], 目前尚无有效的根治方法, 美国早期糖尿病性视网膜病变研究小组(Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, ETDRS)的研究证明, 早期发现、认真随访和干预, 可以使 90%的

DR 患者不发生严重的视力下降, 是预防糖尿病盲的首要方法[2] [3], 国外研究显示早期 DR 中色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)的改变有望成为 DR 早期诊断和预后的指标[4], 国内研究结果显示视网膜电图振荡电位(oscillatory potentials, OPs)总波幅是目前诊断早期糖尿病视网膜病变的最敏感指标, 它不仅能早期发现病变, 还能反映视网膜的进行性损害[5]。为了对其早期诊断、早期治疗, 本研究对各期糖尿病视网膜病变患者房水中 PEDF 浓度变化与 OPs 总波幅进行相关性研究。

2. 资料与方法

2.1. 研究对象

2015 年 1 月至 2015 年 7 月在我院眼科因老年性白内障行晶体超声乳化吸除 + 人工晶状体植入术的患者共 60 例, 其中 2 型糖尿病患者 40 例, 均符合 WHO1999 年 2 型糖尿病诊断标准[6], 糖尿病病程(7.3 ± 5.1)年, 术前空腹血糖均控制在 8.3 mmol/L 以下, 术前行眼底荧光素血管造影检测并分期分组, 其中男 16 例, 女 24 例, 年龄 51~76 岁, 平均 65.1 ± 4.8 岁。经眼部系统检查及眼底荧光造影确诊, 根据 2003 年美国眼科学会制定的糖尿病性视网膜病变分期标准[7]有糖尿病视网膜病变(DR 组) 20 例, 非增殖期糖尿病性视网膜病变(Non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)患者 11 例 11 眼, 增殖期糖尿病性视网膜病变(Proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者 9 例 9 眼。单纯 2 型糖尿病患者组 19 例 19 只眼。对照组为单纯性老年性白内障 20 例 20 眼, 男 11 例 11 眼, 女 9 例 9 眼; 年龄 51~76 岁, 平均年龄 58.4 ± 12.8 岁。研究组患者与对照组之间年龄差异无统计学意义($P < 0.05$)。排除: 并发其它严重全身性疾病者(肾功能不全、明显高血脂、血压控制不佳者); 单眼或双眼屈光介质明显混浊, 影响眼底观察者; 眼底病变已做过治疗者; 伴有其它明显眼底病变者。

2.2. OPs 总波幅测定

术前受检者用 0.5% 托吡卡胺眼液充分扩瞳($\geq 7 \text{ mm}$), 暗适应 30 min 后滴 0.5% 盐酸丙美卡因角膜表面麻醉剂, 暗红光下安装电极, 作用电极使用 Jet 角膜接触电极, 参考电极和地电极使用金箔皮肤电极, 分别置于眼眶颞侧和耳垂。受检者下颌置于 Ganzfeld 球的下颌托上, 两眼注视正前方, 用 Ganzfeld 全视野刺激球作闪光刺激器。OPs 参数采用国际标准 Max 刺激闪光强度 $3.0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}$, 背景光亮度 $0 \text{ cd}/\text{m}$, 闪光间隔 15 s, 放大器通频带宽 100~300 Hz。双眼同时记录, 结果由计算机自动处理分析并打印。操作由同一人完成。

2.3. 房水标本采集

手术室无菌条件下用 1 ml 一次性注射器在角膜缘内 1 mm 行前房穿刺, 针头不触及晶体、虹膜及角膜内皮, 抽取瞳孔中央区未稀释房水 0.2 ml, 注入离心管中, 置于冰上, 放入 -80°C 低温冰箱保存。

2.4. 房水中 PEDF 浓度检测

通过酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测, 采用人类 PEDF (Chemicon international 公司)夹心 ELISA 试剂盒。标准溶液($100 \mu\text{l}$)及待测样品稀释后(1:4)取 $100 \mu\text{l}$ (PEDF 检测前先加入尿素至 8 mol/L 浓度, 在冰上孵育 1 h 后再稀释)加入已包被单克隆抗体 96 孔板, 37°C 孵育 1 h 后, 用洗涤液充分洗涤, 每孔中加入稀释的链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶结合物 $100 \mu\text{l}$, 置 37°C 孵育 1 h, 用洗涤液充分洗涤, 每孔加入 TMB/E 底物 $100 \mu\text{l}$, 置室温反应 5~10 min, 每孔加入 1 滴终止液混匀, 用分光光度计 450 nm 处测吸光度(D)值, 用标准品溶液 D 值画出标准曲线, 根据样品 D 值在该曲线图上查出相应 PEDF 含量。PEDF 检测灵敏度为 $0.9 \text{ ng}/\text{ml}$, 检测范围 $0.9\sim 62.5 \text{ ng}/\text{ml}$, 检测中变异 $\pm 5.3\%$, 检测间变异 $\pm 16.0\%$ 。

2.5. 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。各组患者房水中 PEDF 浓度及 OPs 总波幅用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较各组间房水中 PEDF 浓度及 OPs 总波幅的比值用独立 t 检验检测, PEDF 浓度与 OPs 总波幅相关性用 Pearson 相关性检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

单纯 2 型糖尿病患者组、NPDR 组及 PDR 组的房水中 PEDF 的浓度分别为为 (9.13 ± 4.43) ng/ml、 (7.00 ± 2.04) ng/ml、 (6.39 ± 1.66) ng/ml 与对照组 (13.87 ± 0.36) ng/ml 相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 单纯 2 型糖尿病患者组与 NPDR 组及 PDR 组相比, 房水中 PEDF 浓度亦均明显降低, 差异均有统计学意义 ($P = 0.04, P = 0.02$), 而 NPDR 组与 PDR 组相比无明显统计学差异 ($P = 0.34$), 见图 1; 单纯 2 型糖尿病患者组、NPDR 组及 PDR 组的 OPs 的总振幅值分别为 (164.56 ± 37.41) μ V、 (79.80 ± 19.89) μ V、 (28.55 ± 17.47) μ V 与对照组 (237.96 ± 35.96) 相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 而且组间两两比较亦有明显差异 ($P < 0.01$), 见图 2; 各期糖尿病性视网膜病变房水中 PEDF 浓度变化与 OPs 的总振幅值呈典型的正相关 ($r = 0.905, P < 0.01$), 见图 3。

4. 讨论

1) 由于伦理的原因, 较难获得大量的较好的反映视网膜中 PEDF 水平的无糖尿病性视网膜病变的玻璃体标本。有研究发现在动物实验的房水中的 PEDF 浓度与光感受器基质及玻璃体中 PEDF 浓度具有相关性[8], 所以本研究选择了检测房水标本中 PEDF 的水平以便间接反映其在视网膜中的水平。DR 的最早病理改变为视网膜微血管周细胞丧失及功能障碍。AGEs 或活性氧族(reactive oxygen species, ROS)可抑制视网膜周细胞内 PEDFm-RNA 的表达, 造成 PEDF 水平下降, 而 PEDF 水平的下降可使氧化应激诱导的周细胞凋亡及功能障碍进一步加剧, 从而促进 DR 的进展, 微血管瘤形成, 血管渗漏, 内皮细胞增殖、移行、新生血管形成进入 PDR 期[9]。Ogata 等的临床研究表明 DR 患者玻璃体中 PEDF 水平低于正常对照组, PDR 患者的这种趋势更加明显[10]。本研究中 2 型糖尿病组、NPDR 组及 PDR 组房水中 PEDF 水平低于正常对照组, DR 组患者的这种表现更加明显, 与既往报道结果相一致, 差异有统计学意义, 提示低水平的 PEDF 可能与 DR 的血管发生有关, 伴随 PEDF 浓度的持续降低, 糖尿病视网膜病变程度逐渐加重, 且可导致活动性 PDR 的发生。Matsuoka 等试验表明, 在体外和动物模型 DR 早期, PEDF 转录水平的改变先于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), PEDF 可能是引起 VEGF 改变的启动因素之一[11], 研究通过 PEDF 的治疗有希望更早的发现和阻断新生血管形成[12]。Boehm 等的研究发现视网膜病变的亚组 PEDF 含量明显低于无视网膜病变亚组, 表明 PEDF 是房水血管生成的重要负调节剂, 并且其在房水的低含量可强烈预示糖尿病患者发生视网膜病变的危险性, 提示房水中 PEDF 的水平可作为预测 DR 发生、发展状况的一项指标[13]。PEDF 是一种分泌型糖蛋白, 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族, 能够通过抑制还原型辅酶 II 氧化酶引起的氧化应激的产生防止在早期 DR 中血管通透性的增高及视网膜电图 a 波及 b 波振幅的下降, 提示 PEDF 可能对早期 DR 具有保护作用[14]。本研究中发现 2 型糖尿病组患者房水中 PEDF 水平不仅低于 DR 组, 而且明显低于对照组, 差异有统计学意义, 提示 PEDF 水平的下降可能引起对早期 DR 保护作用的减弱, 最终导致 DR 的发生、发展, 进一步提示在糖尿病视网膜病变前期检测 PEDF 水平下降有可能早期发现病变, 以便早期干预及治疗, 防止或延缓往糖尿病视网膜病变发展。

2) OPs 是视网膜电图的亚成分, 起源于视网膜的内层, 对视网膜血管性病变尤其是循环障碍特别敏感[15]。DR 的微循环改变往往较早影响到视网膜的内层, 因而, 有报道发现当 ERG a、b 波尚正常时已

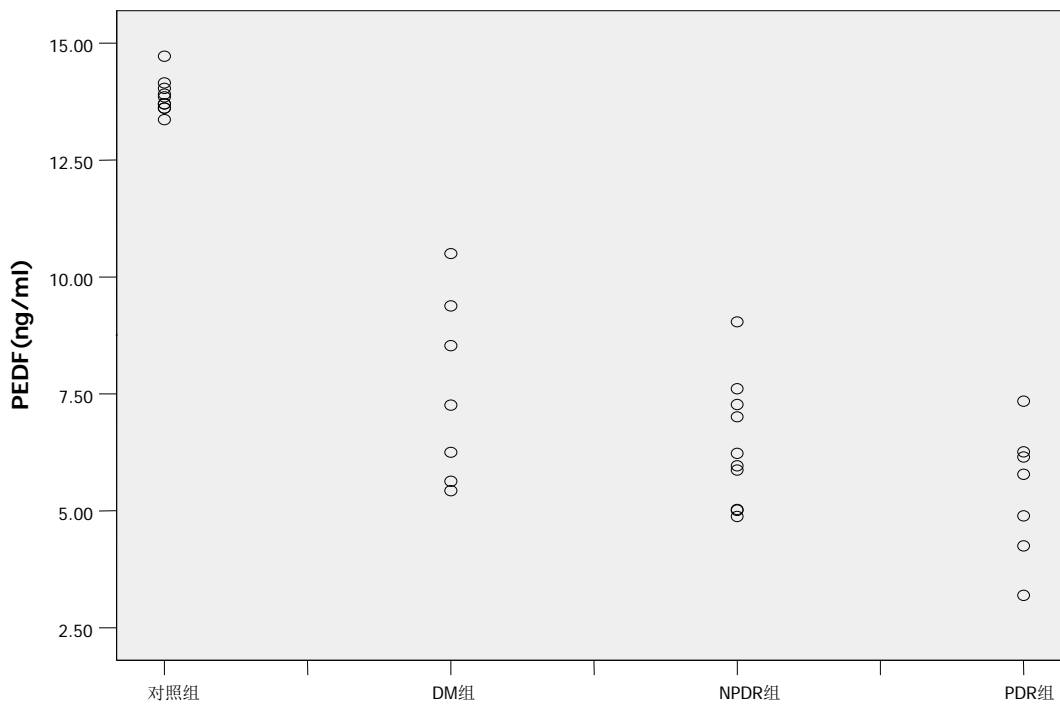


Figure 1. PEDF levels in aqueous humor in different groups

图 1. 各组患者房水中 PEDF 水平

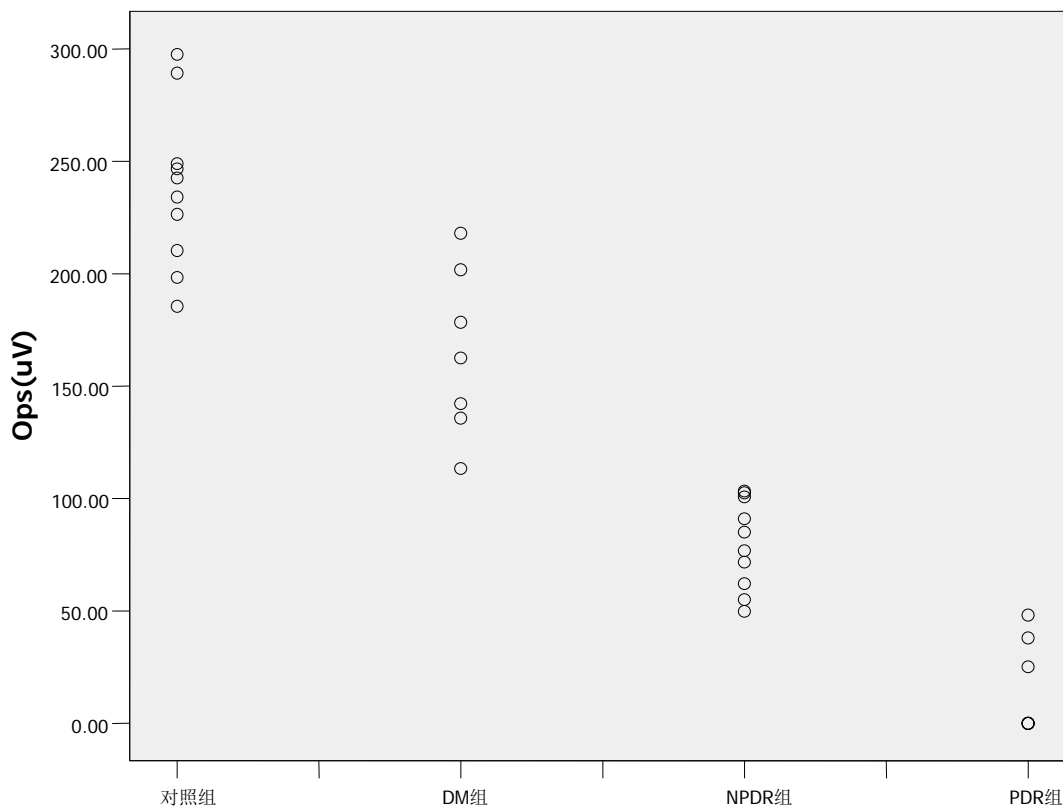


Figure 2. The total amplitude of OPs in different groups

图 2. 各组患者 OPs 总波幅值

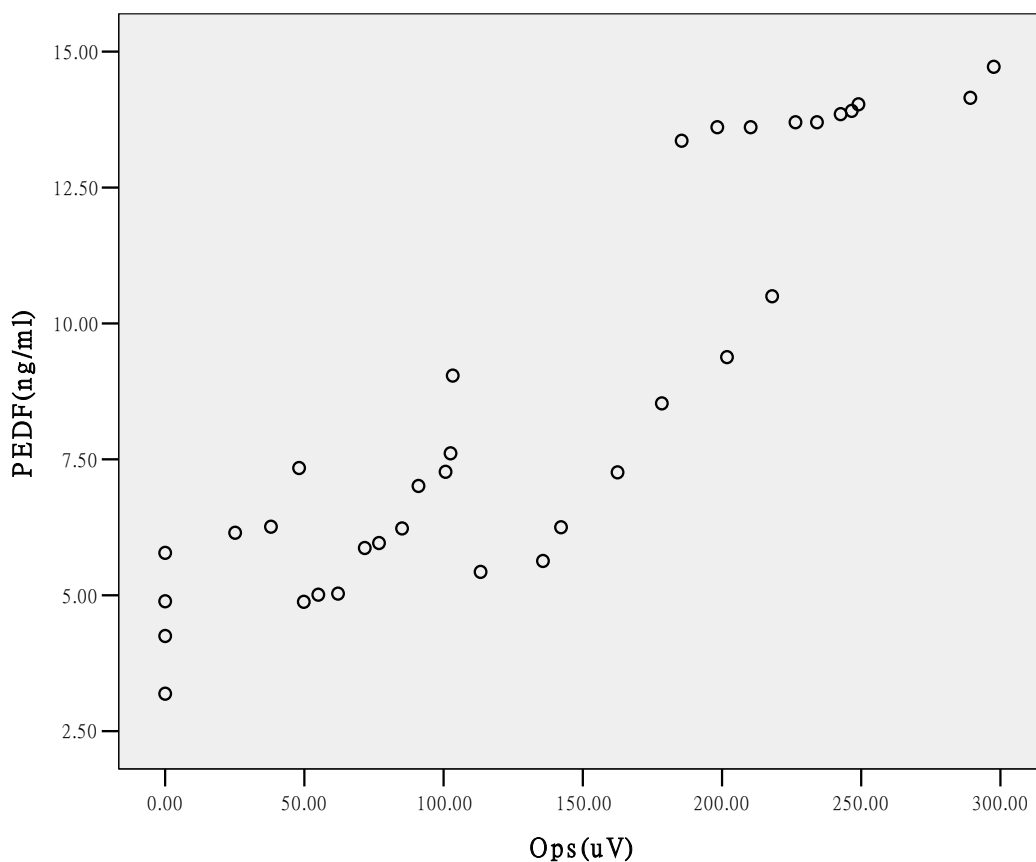


Figure 3. Correlation between PEDF levels in aqueous humor and OPs in different groups
图 3. 各组患者房水中 PEDF 浓度与 OPs 总波幅的相关性

有 OPs 的缺失或明显降低[16]。Leozappa 等认为 OPs 异常可作为 DR 进展的高危标志之一，还可以作为 DR 早期治疗的参考依据[17]。本研究中，观察发现单纯 2 型糖尿病的患者(DR 前期)即有 OPs 总波幅的降低，并且随着糖尿病视网膜病变的加重，OPs 总波幅的变化更加明显，说明在 DR 病程中，视网膜光感受细胞功能异常可先于血管病变，与既往报道结果相一致，本研究结果表明，OPs 总波幅下降幅度可预测 2 型糖尿病人发生 DR，或者 DR 发生、发展的可能。下降幅度越大，DR 进展越快，视网膜功能损害越明显。

3) 本研究中我们还发现，房水中 PEDF 的浓度及 OPs 总波幅呈明显的正相关性，差异具有统计学意义，目前国内外未见相关报道，我们的研究表明当糖尿病病人眼底尚未出现改变时，房水中 PEDF 的浓度及 OPs 总波幅已降低。随着 DR 的发展，二者下降幅度越大。说明在临床上我们可以结合房水中 PEDF 和 OPs 的检测更客观地预测 DR 的发生，早期对 DR 作出诊断，发现视网膜的进行性损害，对 DR 的严重程度作出相应的估计，具有实际的临床应用价值。

参考文献 (References)

- [1] 霍鸣, 张海江, 吴昊, 等. 糖尿病视网膜病变的激光光凝治疗[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(1): 202-203.
- [2] Cantrill, H.L. (1984) The Diabetic Retinopathy Study and the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. *International Ophthalmology Clinics*, **24**, 13-29. <http://dx.doi.org/10.1097/00004397-198402440-00004>
- [3] Josifova, T., Schneider, U., Henrich, P.B. and Schrader, W. (2008) Eye Disorders in Diabetes: Potential Drug Targets. *Infectious Disorders: Drug Targets*, **8**, 70-75. <http://dx.doi.org/10.2174/187152608784746529>

- [4] Boehm, B.O., Lang, G., Feldmann, B., Kurkhaus, A., Rosinger, S., Volpert, O., *et al.* (2003) Proliferative Diabetic Retinopathy Is Associated with a Low Level of the Natural Ocular Anti-Angiogenic Agent Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) in Aqueous Humor. A Pilot Study. *Hormone and Metabolic Research*, **35**, 382-386. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-41362>
- [5] 郭秀瑾, 王长龄, 张怡红, 等. 视网膜振荡电位在糖尿病性视网膜病变早期诊断的价值[J]. 河北医科大学学报, 2002(23): 14-18.
- [6] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 5-797.
- [7] Sandri, F., Ancora, G., Lanzoni, A., *et al.* (2004) Prophylactic Nasal Continuous Positive Airways Pressure in Newborns of 28 - 31 Weeks Gestation: Multicentre Randomised Controlled Clinical Trial. *Archives of Disease in Childhood—Fetal and Neonatal Edition*, **89**, F394-F398. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.2003.037010>
- [8] Hentschel, R. and Jorch, G. (2002) Acute Side Effects of Surfactant Treatment. *Journal of Perinatal Medicine*, **30**, 143-148.
- [9] Nam, D.H., Oh, J., Roh, J.H. and Huh, K. (2009) Different Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Pigment Epithelium-Derived Factor between Diabetic and Non-Diabetic Epiretinal Membranes. *Ophthalmologica*, **223**, 188-191. <http://dx.doi.org/10.1159/000198686>
- [10] Ogata, N., Nishikawa, M., Nishimura, T., Mitsuma, Y. and Matsumura, M. (2002) Unbalanced Vitreous Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor and Vascular Endothelial Growth Factor in Diabetic Retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, **134**, 348-353. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)01568-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394(02)01568-4)
- [11] Matsuoka, M., Ogata, N., Minamino, K. and Matsumura, M. (2007) Leukostasis and Pigment Epithelium-Derived Factor in Rat Models of Diabetic Retinopathy. *Molecular Vision*, **13**, 1058-1065.
- [12] 陈海冰, 贾伟平, 陆俊茜, 包玉倩, 等. 2型糖尿病肾病患者血清色素上皮因子水平的变化及意义[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(18): 1230-1233.
- [13] Boehm, B.O., Lang, G., Volpert, O., Jehle, P.M., Kurkhaus, A., Rosinger, S., *et al.* (2003) Low Content of the Natural Ocular Anti-Angiogenic Agent Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) in Aqueous Humor Predicts Progression of Diabetic Retinopathy. *Diabetologia*, **46**, 394-400.
- [14] Yamagishi, S., Matsui, T., Nakamura, K., Takeuchi, M. and Imaizumi, T. (2006) Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Prevents Diabetes- or Advanced Glycation End Products (AGE)-Elicited Retinal Leukostasis. *Microvascular Research*, **72**, 86-90.
- [15] Bearse Jr., M.A., Shimada, Y. and Sutter, E.E. (2000) Distribution of Oscillatory Components in the Central Retina. *Documenta Ophthalmologica*, **100**, 185-205. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1002783719958>
- [16] Kunikata, H., Nakagawa, Y. and Tamai, M. (2004) Evaluation of Visual Function and Prognosis for Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy with the Low Vision Evaluator. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **204**, 229-236. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.204.229>
- [17] Leozappa, M., Micelli Ferrari, T., Grossi, T., Pace, V., Rinaldi, M.L., Battista, D. and Micelli Ferrari, L. (2008) Prognostic Prediction Ability of Postoperative Multifocal ERG after Vitrectomy for Diabetic Macular Edema. *European Journal of Ophthalmology*, **18**, 609-613.