

2型糖尿病合并白内障患者晶状体上皮细胞中 PEDF 和 VEGF 的表达及意义

胡亚茹^{1,2}, 陈悦¹, 韩雪¹, 陈亚茹¹, 马竹宇², 王剑锋¹

引用: 胡亚茹, 陈悦, 韩雪, 等. 2型糖尿病合并白内障患者晶状体上皮细胞中 PEDF 和 VEGF 的表达及意义. 国际眼科杂志 2023;23(1):109-112

基金项目: 安徽省大学生创新创业计划项目 (No. S202010367029); 蚌埠医学院科技项目 (No.2020byzd141)

作者单位:¹(233004) 中国安徽省蚌埠市, 蚌埠医学院第一附属医院眼科;²(233030) 中国安徽省蚌埠市, 蚌埠医学院

作者简介: 胡亚茹, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 王剑锋, 女, 硕士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障. 7852978@qq.com

收稿日期: 2022-03-31 修回日期: 2022-12-07

摘要

目的: 观察糖尿病合并年龄相关性白内障患者晶状体上皮细胞 (LECs) 中色素上皮衍生因子 (PEDF)、血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的表达水平, 探讨糖尿病合并年龄相关性白内障的发病机制。

方法: 回顾性研究。收集 2020-08/2021-04 在蚌埠医学院第一附属医院眼科就诊的年龄相关性白内障和 2 型糖尿病合并年龄相关性白内障患者各 30 例。所有患者白内障超声乳化术中收取术眼晶状体中央区 5.5~6.0mm 直径的前囊膜标本, 采用蛋白免疫印迹法 (Western-blot) 检测 LECs 中 PEDF、VEGF 蛋白表达水平。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测 PEDF、VEGF mRNA 的相对表达量。

结果: 两组患者 LECs 中均存在 PEDF、VEGF 的表达, 2 型糖尿病合并年龄相关性白内障组患者 VEGF mRNA 相对表达量为 1.364 ± 0.062 , 高于年龄相关性白内障组的 1.000 ± 0.0 ($P < 0.01$), PEDF mRNA 的相对表达量为 0.398 ± 0.053 , 明显低于年龄相关性白内障组的 1.000 ± 0.0 ($P < 0.001$)。2 型糖尿病合并年龄相关性白内障组患者 LECs 中 VEGF 和 PEDF 蛋白表达量为 2.053 ± 0.026 、 0.579 ± 0.045 , 年龄相关性白内障组为 1.680 ± 0.064 、 1.058 ± 0.007 (均 $P < 0.01$)。

结论: 2 型糖尿病合并年龄相关性白内障患者 LECs 中 PEDF 和 VEGF 表达水平发生变化, 可能与糖尿病患者白内障的发生和发展有关。

关键词: 糖尿病合并白内障; 晶状体上皮细胞 (LECs); 色素上皮衍生因子 (PEDF); 血管内皮细胞生长因子 (VEGF)

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.1.21

Expression and significance of pigment epithelium - derived factor and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cells of diabetic patients with cataract

Ya-Ru Hu^{1,2}, Yue Chen¹, Xue Han¹, Ya-Ru Chen¹, Zhu-Yu Ma², Jian-Feng Wang¹

Foundation items: Anhui Innovation and Entrepreneurship Project of College Students (No.S202010367029); Science and Technology Project of Bengbu Medical College (No.2020byzd141)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China;

²Bengbu Medical College, Bengbu 233030, Anhui Province, China

Correspondence to: Jian - Feng Wang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China. 7852978 @qq.com

Received:2022-03-31 Accepted:2022-12-07

Abstract

• **AIM:** To observe the expression levels of pigment epithelium - derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in lens epithelial cells (LECs) of diabetic patients with age - related cataract, and explore the pathogenesis of diabetic with age - related cataract.

• **METHODS:** Retrospectively study. A total of 30 patients with age - related cataract (ARC group) and 30 patients with type 2 diabetes mellitus combined with age - related cataract (DC group) who treated at the Department of Ophthalmology of the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College from August 2020 to April 2021 were collected. Anterior capsule specimens with a diameter of 5.5 - 6.0mm in the central region of the intraoperative eye were collected during phacoemulsification. The protein expression levels of PEDF and VEGF in LECs were detected by Western - blot. Quantitative real - time PCR (qRT - PCR) was used to detect the relative mRNA expression levels of PEDF and VEGF.

• **RESULTS:** PEDF and VEGF were expressed in LECs of both groups, and the relative expression of VEGF mRNA in DC group was 1.364 ± 0.062 , which was higher than that of ARC group (1.000 ± 0.0 ; $P < 0.01$). The relative mRNA expression level of PEDF was 0.398 ± 0.053 , which was significantly lower than 1.000 ± 0.0 in the ARC group ($P < 0.001$). The expression of VEGF protein in LECs was $2.053 \pm$

0.026 in DC group and 1.680 ± 0.064 in ARC group, respectively. Meanwhile, the expression of PEDF protein was 0.579 ± 0.045 in DC group and 1.058 ± 0.007 in ARC group (all $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** The changes of PEDF and VEGF expression levels in LECs may be related to the occurrence and development of cataract in diabetic patients.

• **KEYWORDS:** diabetes mellitus with cataract; lens epithelial cells (LECs); pigment epithelium-derived factor (PEDF); vascular endothelial growth factor (VEGF)

Citation: Hu YR, Chen Y, Han X, *et al.* Expression and significance of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cells of diabetic patients with cataract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023; 23 (1): 109-112

0 引言

白内障的发病机制复杂,目前仍未完全明确。年龄相关性白内障被认为是晶状体衰老过程,同时伴随晶状体上皮细胞(lens epithelial cells,LECs)功能性改变和多种细胞因子的表达异常。研究表明色素上皮细胞衍生因子(pigment epithelium-derived factor,PEDF)表达与衰老有密切的关系^[1]。刘恬等^[2]研究发现6岁以下的先天性白内障LECs中PEDF的表达水平远高于50岁以上年龄相关性白内障,提示PEDF的表达下调可能导致晶状体的老化,下调程度随着晶状体的混浊程度加重进一步加重。糖尿病患者更容易发生白内障,具体机制尚不明确,本研究通过检测2型糖尿病合并年龄相关性白内障患者LECs中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和PEDF表达水平,探讨2型糖尿病合并年龄相关性白内障的发病机制,为预防和减缓糖尿病患者发生白内障提供新的途径。

1 对象和方法

1.1 对象 回顾性研究。选择2020-08/2021-04在蚌埠医学院第一附属医院眼科就诊并实施手术的2型糖尿病合并年龄相关性白内障和年龄相关性白内障患者各30例30眼。纳入标准:(1)年龄50~80岁;(2)白内障病史大于1a;(3)均符合白内障诊断标准,并且均有手术指征,无影响视力的严重并发症;(4)白内障核硬度分级^[3-4] \geq II级;(5)手术均顺利;(6)晶状体后囊膜完整;(7)2型糖尿病合并年龄相关性白内障患者糖尿病病史大于1a,血糖水平控制平稳,术前未发现糖尿病视网膜病变。排除标准:(1)合并增殖性糖尿病视网膜血管疾病、视神经炎、葡萄膜炎、高度近视、青光眼等病史;(2)合并除糖尿病之外的其它系统性疾病;(3)合并严重干眼;(4)过熟期白内障;(5)有眼部外伤、手术及眼底激光史;(6)临床资料不完整。所有患者均知情同意,并已通过蚌埠医学院第一附属医院伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 Trizol试剂(购自Invitrogen公司)、SYBR® Green (Takara公司)、ECL化学发光试剂盒(Millipore公司)、逆转录试剂(ThermoFisher公司)、蛋白

浓度检测试剂盒(碧云天公司);VEGF和PEDF抗体(Proteintech公司),HRP标记抗体(Biosharp公司);Tecan M1000多功能酶标仪(美国Bio-Tex公司)、组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司)、Real-time PCR仪(7500)(美国ABI公司)、Nanpdrop one超微量核酸蛋白浓度测定仪(ThermoFisher公司)。

1.2.2 标本采集 常规白内障超声乳化吸除术中连续环形撕囊,撕除晶状体中央5.5~6.0mm的前囊膜(含LECs),将切口处的血擦干净,再将囊膜从切口取出,然后用生理盐水冲洗,清除囊膜表面残留的黏弹剂、血迹、房水;将囊膜分为2份,两份大小尽量相似,一份立即放入无菌EP管中,-80℃冰箱保存,用于蛋白检测。另一份放入含Trizol的EP管-20℃冰箱保存以进行mRNA的检测。

1.2.3 qRT-PCR检测LECs中VEGF和PEDF mRNA的表达 因单个囊膜中蛋白和RNA含量较少,根据预实验统计处理结果,标本按相近原则将10例囊膜标本(每例为半个囊膜)合并为1组样本。使用组织碾磨机对两组样本进行粉碎性碾磨,用Trizol法提取两组标本的总RNA,20 μ L的DEPC液进行溶解,然后测量两组RNA的浓度及纯度,RNA纯度较好时根据不同的RNA浓度逆转录成RNA对应的第一链cDNA。逆转录完成后按照相同比例对其进行适当稀释,同时按照引物说明书将引物浓度稀释至10 μ mol/L,震荡混匀之后进行qRT-PCR加样和上机,检测VEGF和PEDF mRNA的相对表达量。独立重复实验3次。

1.2.4 Western-blot检测LECs中VEGF和PEDF蛋白的含量 标本按相近原则将10例囊膜标本(每例为半个囊膜)合并为1组样本。使用组织碾磨机对两组样本进行粉碎性碾磨,加入裂解液对组织进行裂解,提取总蛋白,然后以标准BCA蛋白试剂盒进行蛋白定量。按照Western-blot标准程序进行制胶、上样、电泳、转膜和显色,最后等体积混合A液和B液(0.5mL:0.5mL)配制成ECL发光液并以凝胶成像系统进行曝光成像,用Image J软件对条带进行灰度分析,观察VEGF和PEDF蛋白的表达情况。晶状体囊膜标本按相近原则将10例合并为1组样本,独立重复实验3次。

统计学分析:应用Graphpad8.3统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本t检验,计数资料以n表示,采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较 本研究共纳入年龄相关性白内障和2型糖尿病合并年龄相关性白内障患者各30例。两组患者性别及晶状体核硬度,差异均无统计学意义($P > 0.01$),两组患者年龄比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表1。

2.2 两组患者LECs中VEGF和PEDF mRNA表达情况

两组患者LECs中均存在VEGF、PEDF的表达。2型糖尿病合并年龄相关性白内障组中VEGF mRNA表达水平高于年龄相关性白内障组,差异有统计学意义($P < 0.01$);而2型糖尿病合并年龄相关性白内障组中PEDF mRNA水平低于年龄相关性白内障组患者,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表2。

表1 两组患者一般资料比较

分组	例数/眼数	平均年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	性别(例)		核硬度分级(眼)		
			男	女	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅳ级
年龄相关性白内障组	30/30	73.930±0.927	11	19	8	16	6
2型糖尿病合并年龄相关性白内障组	30/30	64.470±1.262	12	18	10	13	7
$\chi^2/\nu/Z$		6.045	0.071		0.610		
<i>P</i>		<0.01	0.791		0.737		

表2 两组患者 LECs 中 VEGF 和 PEDF mRNA 及蛋白的表达情况

分组	眼数	mRNA 表达		蛋白表达		$\bar{x} \pm s$
		VEGF	PEDF	VEGF	PEDF	
		年龄相关性白内障组	30	1.000±0.0	1.000±0.0	
2型糖尿病合并年龄相关性白内障组	30	1.364±0.062	0.398±0.053	2.053±0.026	0.579±0.045	
<i>t</i>		5.909	11.410	5.356	10.460	
<i>P</i>		0.0041	0.0003	0.0059	0.0005	

2.3 两组患者 LECs 中 VEGF 和 PEDF 蛋白表达情况

2型糖尿病合并年龄相关性白内障组患者 LECs 中 VEGF 蛋白的表达量高于年龄相关性白内障组患者,差异有统计学意义($P < 0.01$);2型糖尿病合并年龄相关性白内障组患者 LECs 中 PEDF 的蛋白表达量低于年龄相关性白内障组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表2。

3 讨论

与年龄相关性白内障相比,糖尿病患者白内障发生早,进展快,是糖尿病主要并发症之一,发病机制目前尚不清楚,近年研究其与多种细胞因子的表达异常有关。VEGF 是新生血管形成的强效诱导因子,可由多种细胞分泌,刺激新生血管生长,大量研究主要聚焦在糖尿病视网膜病变、湿性年龄相关性黄斑变性等眼部新生血管性疾病,呈高表达状态。PEDF 是一种多效能多肽因子^[5],分布于全身多种组织并参与其生理病理过程,1999年 Dawson 等^[6]首次发现 PEDF 具有很强的血管抑制作用,对多种血管生成刺激因子具有活性。PEDF 已在眼内多种组织中检测到,调节正常血管状态及视网膜分化,角膜、玻璃体等眼内无血管组织透明非血管状态的维持可能与 PEDF 有关^[7]。

PEDF 与 VEGF 被公认为是一对新生血管生成调控因子,大量研究证明这一对因子在视网膜新生血管相关疾病中发挥着重要作用。PEDF 与 VEGF 具有相反的作用,当 PEDF 表达下降时,VEGF 表达水平升高,二者之间相互制约,相互调节,在正常视网膜组织中 VEGF、PEDF 的表达维持在一定的水平,参与视网膜某些正常生理功能,两者保持着平衡,相互制约。当患者由于高血糖、血管阻塞等原因,使视网膜微循环障碍,导致视网膜缺血,两者之间的平衡关系被打破,视网膜组织中 VEGF 表达升高,PEDF 表达减少,在非增殖期和临床前期视网膜血管病变中发挥了重要的作用,并促进了糖尿病视网膜病变的发展^[8]。汪浩等^[9]观察2型糖尿病患者房水中 VEGF 水平升高,PEDF 表达水平明显降低,提示糖尿病患者房水中存在 VEGF 与 PEDF 的失衡,可能与糖尿病视网膜病变的发生、发展有

关。陈艳文^[10]观察糖尿病合并白内障患者房水中 VEGF 及炎症因子 IL-6、IL-8 的表达明显升高,我们以前的研究结果也显示糖尿病合并白内障患者房水中 IL-6、VEGF 的表达升高,并与术后黄斑水肿有一定的相关性,提示炎症反应及眼内 VEGF 水平的变化与糖尿病患者白内障的发生有密切相关性^[11]。

2005年 Segev 等^[12]利用 cDNA 微阵列技术发现人晶状体前囊下的 LECs 中存在 PEDF。进一步研究发现 PEDF 的表达位于 LECs 胞浆内^[13]。根据在其它组织细胞中 PEDF 生物学特性的研究结果^[14-15],PEDF 可反映细胞增殖潜能,而且在细胞周期复杂的调控网络中起负性效应,是表达广泛的细胞生存/保护因子。晶状体作为一个无血管组织,认为晶状体中合成与表达 PEDF 是为了维持无血管化,推测 PEDF 的存在可能是晶状体在进化过程中获得的血管生成抵御机制。

刘恬等^[16]检测到6岁以下的先天性白内障 LECs 中 PEDF 的表达水平远高于50岁以上年龄相关性白内障,提示 PEDF 的表达下调可能导致晶状体的老化。进一步研究发现年龄相关性白内障前囊下 LECs 中 PEDF 的蛋白和基因表达及其水平随着晶状体混浊程度的增加呈下降趋势^[14]。糖尿病患者更容易发生白内障,具体机制尚不明确,既往研究结果显示糖尿病患者房水中存在 VEGF 与 PEDF 的失衡,糖尿病白内障患者晶状体上皮细胞中 PEDF、VEGF 的表达水平是否存在同样的变化,尚未见报道。本研究结果显示与年龄相关性白内障患者相比,2型糖尿病合并白内障患者 LECs 中的 VEGF 的表达水平升高,相反 PEDF 的表达水平明显降低,与以往研究的糖尿病患者视网膜组织、房水中的变化趋势一致^[8-10],因此我们推测2型糖尿病合并白内障患者 LECs 中也同样存在 PEDF、VEGF 表达的失衡,并且比年龄相关性白内障的平衡失调更明显,这种平衡的明显失调可能导致了糖尿病患者更早发生白内障、并且进展更快。干预眼内 PEDF、VEGF 水平可能为预防和减缓糖尿病患者发生白内障提供新的途径,也为糖尿病视网膜病变的治疗提供更长的时间窗。

参考文献

1 Francis MK, Appel S, Meyer C, *et al.* Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2004;122(5):1096-1105

2 刘恬, 刘奕志, 钟惟德, 等. 色素上皮衍生因子对晶状体上皮细胞生长的促进作用及其机制. *中华实验眼科杂志* 2015;33(4):342-346

3 谢坦. 手术治疗晶状体核硬度IV~V级年龄相关性白内障效果分析. *深圳中西医结合杂志* 2021;31(02):107-108

4 胡春玲, 张晓农, 惠延年. 老年性白内障晶状体核硬度及相关因素研究. *中华眼科杂志* 2000;(05):16-19

5 Tombran - Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(8):1700-1707

6 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, *et al.* Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248

7 Karakousis PC, John SK, Behling KC, *et al.* Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 2001;7:154-163

8 李艳, 李筱荣, 袁佳琴, 等. 糖尿病大鼠视网膜中 VEGF、PEDF 的

表达与血-视网膜屏障损伤. *眼科新进展* 2013;33(1):29-32

9 汪浩, 张伟英, 赵庆宁, 等. 2型糖尿病患者房水中 VEGF 及 PEDF 水平的研究. *同济大学学报(医学版)* 2013;34(4):50-53,57

10 陈艳文. 糖尿病性白内障患者血清与房水中细胞因子表达的变化. *国际眼科杂志* 2020;20(11):1946-1949

11 余芝红, 李娜, 赵思婕, 等. 糖尿病性白内障患者房水中 VEGF、IL-6 水平及其与术后黄斑水肿的相关性分析. *齐齐哈尔医学院学报* 2018;39(6):644-647

12 Segev F, Mor O, Segev A, *et al.* Downregulation of gene expression in the ageing lens: a possible contributory factor in senile cataract. *Eye* 2005;19(1):80-85

13 胡昕滢, 栾洁. 色素上皮衍生因子在人晶状体上皮细胞中的表达. *东南大学学报(医学版)* 2019;38(2):343-346

14 Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(8):628-636

15 Amano S. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvasc Res* 2005;69(1-2):45-55

16 刘恬, 刘奕志, 项道满. 色素上皮衍生因子在人晶状体上皮细胞表达的意义. *国际眼科杂志* 2011;11(6):973-975