

糖尿病视网膜病变玻璃体中 CTGF, SDF-1 的质量浓度测定

丁 纯

作者单位:(410011) 中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科

作者简介:丁纯,女,博士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:丁纯. nicezoe@sina.com

收稿日期:2009-03-30 修回日期:2010-06-28

Quantitative measurement of connective tissue growth factor and stromal cell-derived factor-1 in vitreous with diabetic retinopathy

Chun Ding

Department of Ophthalmology, Xiangya Second Hospital of Zhongnan University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Chun Ding, Department of Ophthalmology, Xiangya Second Hospital of Zhongnan University, Changsha 410011, Hunan Province, China. nicezoe@sina.com

Received:2009-03-30 Accepted:2010-06-28

Abstract

• **AIM:** To measure the concentration of connective tissue growth factor (CTGF) and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) in vitreous and to observe its relationship with diabetic retinopathy (DR) formation.

• **METHODS:** By enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method, the concentration of SDF-1 and CTGF in vitreous in 33 cases of proliferative diabetic retinopathy (PDR), 5 cases of background diabetic retinopathy (BDR) and 5 cases of normal control were measured.

• **RESULTS:** CTGF concentration in vitreous of PDR patients was significantly increased compared with that in normal group ($P < 0.01$), BDR patients ($P < 0.01$). SDF-1 level in vitreous of PDR compared with BDR was significantly increased ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** SDF-1 and CTGF may play certain role in the development of PDR.

• **KEYWORDS:** connective tissue growth factor; stromal cell-derived factor-1; diabetic retinopathy

Ding C. Quantitative measurement of connective tissue growth factor and stromal cell-derived factor-1 in vitreous with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(7):1314-1315

摘要

目的:定量测定结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,

DR)患者玻璃体中的质量浓度,探讨其在糖尿病(diabetic retinopathy, DR)发病机制中的作用。

方法:采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)定量检测33例增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)、5例单纯型糖尿病性视网膜病变组(background diabetic retinopathy, BDR组)及5例正常对照组玻璃体中CTGF的质量浓度。

结果:PDR组玻璃体中CTGF质量浓度大于对照组($P < 0.01$)、BDR组($P < 0.01$)。PDR组玻璃体中SDF-1质量浓度大于BDR组($P < 0.05$)。

结论:SDF-1, CTGF在DR发展过程中起着一定的作用。

关键词:结缔组织生长因子;基质细胞衍生因子1;糖尿病视网膜病变

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.07.024

丁纯. 糖尿病视网膜病变玻璃体中CTGF, SDF-1的质量浓度测定. 国际眼科杂志2010;10(7):1314-1315

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是目前最常见的视网膜新生血管性疾病,可最终导致玻璃体反复出血、牵拉性视网膜脱离、新生血管性青光眼等而致视力严重受损。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种新近发现的细胞因子,有研究表明可促进血管内皮细胞的黏附、增殖和迁移,可促进血管生成^[1]及纤维化,基质细胞衍生因子SDF-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)是新近发现的具有趋化活性作用的细胞因子,有实验证实小鼠缺血性视网膜疾病组织中发现SDF-1表达增加,与视网膜缺血组织中新生血管形成密切相关^[2]。本研究通过测定不同患者玻璃体中CTGF, SDF-1的含量,进一步探讨CTGF, SDF-1在DR发病机制中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象 同期收治的糖尿病患者38例,男23例,女15例;年龄32~70(56.6±9.3)岁。均符合1999年WHO糖尿病诊断标准,为2型糖尿病患者,每例均行视力、眼压、裂隙灯、直接检眼镜、间接检眼镜及眼底荧光血管造影检查,根据1984年全国眼底病学术会议制定的DR的诊断及分期标准,分为PDR和BDR。其中PDR组33例, BDR组5例(因严重黄斑囊样水肿行玻璃体切除手术),正常对照组4例为角膜移植供体眼,排除糖尿病及其他眼底病变。主要试剂:CTGF的ELISA试剂盒(Biotech公司),人夹心SDF-1βELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 玻璃体采集 行标准三通道平坦部玻璃体切除术,打开灌注前,用1mL注射器连接到切割头的抽吸管,一边

切割一边从 1mL 注射器中抽吸没有被稀释的玻璃体 0.5mL, 移至 eppendorf 管内, 置于-70℃ 冰箱保存。

1.2.2 CTGF 的测定 -70℃ 保存的标本置于室温下, 使用前离心处理。在 96 孔酶联免疫反应板上加入玻璃体及标准品, 每孔 100 μ L。酶标板加上盖, 37℃ 反应 90min。反应后甩去酶标板内液体, 再对着吸水纸拍几下, 不洗。将准备好的生物素抗人 SDF-1 抗体工作液按每孔 0.1mL 依次加入 (TMB 空白显示孔除外)。37℃ 反应 60min。0.01mol/L TBS 或 0.01mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次浸泡 1min 左右。将准备好的 ABC 工作液按每孔 0.1mL 依次加入 (TMB 空白显示孔除外)。37℃ 反应 30min。0.01mol/L TBS 或 0.01mol/L PBS 洗涤 5 次, 每次浸泡 1min 左右。按每孔 90 μ L 依次加入 TMB 显示液, 37℃ 避光反应 20 ~ 25min。按每孔 0.1mL 依次加入 TMB 终止液。所有的标准品和样品的吸光值均应减去零孔的吸光值, 用酶标仪在 450nm 处测定 OD 值, 并读出相对应的浓度值。

统计学分析: 各组玻璃体中的 CTGF 和 SDF-1 的含量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件包对实验结果进行秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。直线相关分析 CTGF 和 SDF-1 的关系。

2 结果

PDR 患者 33 例玻璃体中 CTGF 平均含量为 472.54 ± 238.15 pg/mL; BDR (5 例) 玻璃体中 CTGF 平均含量为 142.08 ± 119.50 pg/mL; 正常对照组 (5 例) 玻璃体中 CTGF 平均含量为 127.9 ± 55.92 pg/mL。PDR 患者 CTGF 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), BDR 患者明显低于 PDR 患者水平 ($P < 0.01$), BDR 组与正常对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。PDR 患者 (30 例) 玻璃体中 SDF-1 平均含量为 127.90 ± 43.74 pg/mL, 其中 3 例未检出 SDF-1 含量; BDR (4 例) 玻璃体中 CTGF 平均含量为 81.93 ± 14.79 pg/mL, 其中 1 例未检出 SDF-1 含量; 正常对照组 (5 例) 玻璃体中未检出 SDF-1 含量。PDR 患者 SDF-1 水平高于 BDR 患者 ($P < 0.05$) PDR 患者玻璃体中 CTGF 和 SDF-1 浓度不相关 ($r = 0.32, P > 0.05$)。

3 讨论

DR 致盲的主要原因是发展到 PDR 阶段, 玻璃体腔中新生血管和纤维增生。PDR 本质上也是一种创伤愈合的修复反应, 包括血管新生、炎症细胞的聚集、以及成纤维母细胞的增生。病变发展到纤维化阶段, 因纤维血管的收缩导致出血、视网膜脱离, 最终不可避免的失明。有研究表明, 有很多生长因子参与了 PDR 的形成, 例如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子、肝细胞生长因子^[3] 等。CTGF 被视为 TGF- β 1 的下游效应介质, 在创伤修复、组织纤维化进程中起重要作用。同时有研究证实重组 CTGF 在角膜中可导致血管新生, 及在活体内可促进纤维化^[3]。在视网膜下新生血管中可发现 CTGF 的表达^[4]。这些都提示着 CTGF 可能是新生血管形成及纤维化的一个诱因。本研究显示, 生理情况下玻璃体内存在一定量的 CTGF (127.9 ± 55.92 pg/mL), 检测发现正常眼玻璃体中 CTGF 含量较低, 以往研究资料表明泪液、房水、血液等各种体液中均有 CTGF 存在^[5-7], 是维持眼正常组织代谢及功能的基本因素。发现 PDR 患者玻璃体中 CTGF 的质量浓度为 472.54 ± 238.15 pg/mL, 明显高于正常对照组及 BDR 组。这提示着 CTGF 在 PDR 的发生过程中起着一定的作用, 可能促进新生血管形成及

纤维化。与国外的研究发现 DR 患者玻璃体中 CTGF 的浓度升高, 导致新生血管形成更活跃^[8] 的观点一致。CTGF 促进新生血管形成及纤维化的机制可能是促进细胞有丝分裂和增生、趋化细胞、诱导细胞粘附、促进细胞外基质的合成^[9], 但关于 CTGF 在 DR 发展中的作用尚需进一步研究。30 例 PDR 患者玻璃体中检测到 SDF-1 (127.90 ± 43.74 pg/mL), 4 例 BDR 患者玻璃体中检测到 SDF-1 (81.93 ± 14.79 pg/mL), PDR 患者 SDF-1 水平高于 BDR 患者 ($P < 0.05$)。这提示 SDF-1 与 PDR 的发生存在一定的关系, 可能参与了新生血管的形成。目前有观点认为 SDF-1 和其受体 CXCR4 特异性结合后形成的 SDF-1/CXCR4 轴参与了新生血管的形成: (1) 有研究表明血管内皮前体细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 在新生血管形成中起主要作用, 而 SDF-1/CXCR4 轴在 EPCs 细胞归巢、动员及分化中起至关重要的作用, 缺血组织的 SDF-1 的过度表达会引起更多的 EPCs 汇集, 从而导致了缺血组织的新生血管形成^[10]。(2) SDF-1 能刺激 VEGF 在内皮细胞中表达^[11], 而 VEGF 能在培养的内皮细胞中上调 CXCR4 的浓度。SDF-1 促 VEGF 生成, VEGF 通过上调 CXCR4 浓度加强内皮细胞对 SDF-1 的应答, 从而形成协同作用。正常人玻璃体未检测出 SDF-1, 可能与国内生产的 ELISA 试剂盒灵敏度不高 (最低敏感剂量为 62.5pg/mL) 有关。PDR 患者玻璃体中 CTGF 与 SDF-1 浓度无明显相关 ($r = 0.32, P > 0.05$), 可能 CTGF 与 SDF-1 是由激活细胞产生的两种独立性细胞因子, 它们相互作用, 共同促进 PDR 的发生。

参考文献

- 1 Yang R, Amir J, Liu H. Mechanical strain activates a program of genes functionally involved in paracrine signaling of angiogenesis. *Physiol Genomics* 2008;36(1):1-14
- 2 Lai P, Li T, Yang J, et al. Upregulation of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) expression in microvasculature endothelial cells in retinal ischemia-reperfusion injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(12):1707-1713
- 3 Esther J, Kuiperl, Frans A, et al. The angio-fibrotic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy. *Plos One* 2008;3(7):2675
- 4 Watanabe D, Takagi H, Suzuma K, et al. Expression of connective tissue growth factor and its potential role in choroidal neovascularization. *Retina* 2005;25(7):911-918
- 5 Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000;27(1):149-154
- 6 van Setten GB, Blalock TD, Grotendorst G. Detection of connective tissue growth factor in human aqueous humor. *Ophthalmic Res* 2002;34(5):306-308
- 7 van Setten GB, Blalock TD, Grotendorst G. Detection of connective tissue growth factor in human tear fluid: preliminary results. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81(1):51-53
- 8 Hinton DR, Spee C, He S, et al. Accumulation of NH(2)-terminal fragment of connective tissue growth factor in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004;27(3):758-764
- 9 Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor2 β : a potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis* 2001;38(4):134-138
- 10 Xiao QZ, Ye S, Oberhollenzer F, et al. SDF1 Gene variation is associated with circulating SDF1 α level and endothelial progenitor cell number-The bruneck study. *Plos One* 2008;3(12):4061
- 11 马晓均, 徐格致. 基质细胞衍生因子-1 与增生性糖尿病视网膜病变的研究进展. *世界临床药物* 2007;28(7):394-403