

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.008

湿性老年性黄斑变性患者血浆脂联素水平的研究

王 隽, 彭 惠, 毛丹娜, 付 鹏, 银娟萍, 雷 博

(重庆医科大学附属第一医院眼科、重庆市眼科学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察湿性老年性黄斑变性(Age-related macular degeneration, AMD)患者的血浆脂联素(Adiponectin, APN)水平及外周血单个核细胞的 APN 受体 1、受体 2 的表达水平。方法:15 个患者[平均年龄(69.07 ± 6.71)岁]和 15 个健康对照[平均年龄(64.2 ± 7.46)岁]纳入本研究。所有人都不患有糖尿病、高脂血症、肾脏疾病、冠心病、心脏功能衰竭、肾脏功能衰竭等疾病。血浆 APN 水平由 ELISA 测定。外周血单个核细胞的 APN 受体表达水平由 Real-time PCR 测定。采用 Pearson 相关分析处理两变量相关性分析,包括血浆 APN 分别与临床指标、APN 受体表达水平、内环境稳态模型评估的胰岛素抵抗指数(Homoeostasis model assessment insulin resistance, HOMA-IR)。结果:病例组血浆 APN 水平明显低于对照组,分别是(1.18 ± 0.65) $\mu\text{g/ml}$ 和 (2.00 ± 0.63) $\mu\text{g/ml}$, $P=0.002$ 。还发现病例组的血糖水平明显高于对照组,分别是(5.42 ± 0.64) mmol/L 和 (4.79 ± 0.39) mmol/L , $P=0.003$ 。但是,2 组的外周血单个核细胞的 APN 受体的 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:血浆 APN 浓度在湿性 AMD 患者中是降低的,提示与 APN 相关的胰岛素抵抗可能存在于湿性 AMD 的病理性血管新生过程中。

【关键词】脂联素;胰岛素抵抗;脉络膜新生血管;湿性老年性黄斑变性

【中国图书分类法分类号】R774.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-30

Plasma adiponectin level in patients with wet age-related macular degeneration

WANG Jun, PENG Hui, MAO Danna, FU Peng, YIN Juanping, LEI Bo

(Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

Key Laboratory of Ophthalmology in Chongqing)

【Abstract】Objective: To observe the level of plasma adiponectin (APN) in patients with wet age-related macular degeneration (wet AMD) as well as the expression levels of the APN receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Methods:** Fifteen patients with an average age of (69.07 ± 6.71) year-old (excluding patients with diabetes mellitus, hypertension, hyperlipidaemia, nephropathy, coronary heart disease, heart failure and renal failure) were enrolled as the case group while 15 healthy subjects with an average age of (64.2 ± 7.46) year-old were enrolled as the control group. The level of plasma APN was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay and the expression levels of APN receptors in PBMC were examined by real-time quantitative PCR. The correlations between plasma APN and clinical indicators, the expression levels of APN receptors, homeostasis model assessment indexes of insulin resistance (HOMA-IR) were analyzed by Pearson's correlation. **Results:** APN concentrations in the case group were significantly lower than those in the control group [$(1.18 \pm 0.65) \mu\text{g/ml}$ vs. $(2.00 \pm 0.63) \mu\text{g/ml}$, $P=0.002$]. Blood glucose was significantly higher in the case group compared with those in the control group [$(5.42 \pm 0.64) \text{mmol/L}$ vs. $(4.79 \pm 0.39) \text{mmol/L}$, $P=0.003$]. However, there was no significant difference in mRNA levels of AdipoR1 and AdipoR2 in PBMC between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion:** Plasma APN concentration is lower in patients with wet AMD, indicating that APN-related insulin resistance

作者介绍:王 隽(1985-),男,硕士,

研究方向:眼底病,眼外伤。

通信作者:彭 惠,女,教授,Email:pengh9@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(编号:2010-02-073)。

[17] 徐丽丽,高世勇.细胞凋亡相关蛋白的研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2008,29(11):1361-1362.

Xu L L, Gao S Y. Advances in study on cell apoptosis related protein[J]. Journal of Qiqihar Medical School, 2008, 29(11):1361-1362.

[18] 何子毅,孟庆勇.电离辐射与细胞凋亡[J].国外医学·放射医学核医学分册,2004,28(2):90-93.

He Z Y, Meng Q Y. Ionizing radiation and cell apoptosis[J]. Foreign Medi-

cal Sciences. Section of Radiation Medicine and nuclear Medicine, 2004, 28(2):90-93.

[19] Hai C X. Investigation of synergistic action of antioxidants and the traditional Chinese medicine[A]. In: National foundation committee CSTA Life Science and Biotechnology[M]. Beijing: Beijing publishing Co. of CSTA, 1998:324-327.

(责任编辑:唐秋姗)

may be involved in the pathologic neovascularization of wet AMD.

【Key words】adiponectin; insulin resistance; choroidal neovascularization; wet age-related macular degeneration

老年性黄斑变性 (Age-related macular degeneration, AMD) 是全世界范围内最普遍的致盲疾病之一, 而且其发病率不断升高^[1]。特别是湿性 AMD, 以脉络膜新生血管 (Choroidal neovascularization, CNV) 为病理特征, 是导致严重的不可逆性视力损伤的主要原因^[2]。由于我国人口结构的老龄化, 湿性 AMD 对老年人生活水平的影响随着其发病率的增加而升高。当前的治疗措施, 包括光动力学治疗和抗新生血管药物, 都集中于逆转血管新生的过程^[2]。鉴于即便联合当前的治疗措施也只能得到有限疗效的现状和最近研究的结果提示, 人体系统的其他因素可能在该疾病的严重程度和预后情况中起到重要作用^[3]。

脂联素 (Adiponectin, APN) 是 1 种新型的蛋白质激素, 由脂肪细胞专一分泌然后进入血流从而调节一系列新陈代谢过程, 包括血糖水平的调节和脂肪酸的分解代谢, 从而防止 2 型糖尿病、肥胖和动脉粥样硬化的发生^[4]。已有报道发现低血浆 APN 水平存在于病理性的血管新生疾病^[5,6]。同时, 在激光诱导 CNV 的动物模型中证实了 APN 的抗新生血管作用^[7,8]。但是, 湿性 AMD 患者的血浆 APN 水平却没有被报道过。

另外, 最近的研究提示湿性 AMD 的病理过程有炎症成分的参与^[9]。同时, 一些研究证实 APN 具有抗炎作用^[10,11]。APN 的 2 个受体, 受体 1 (AdipoR1) 和受体 2 (AdipoR2) 存在于外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 而且在终末肾病患者中, 上述 2 种受体表达量的增加可能具有适当的抗炎作用^[12]。因为 APN 及其受体信号通道可能受到其受体表达量的影响, 所以值得研究湿性 AMD 患者的 AdipoR 表达情况。

因此, 本研究测定了湿性 AMD 患者的血浆 APN 水平, 同时运用 Real-time PCR 检测了 PBMC 中 AdipoR 的 mRNA 水平。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 15 例患者 (8 例男性; 7 例女性; 年龄 57 ~ 79 岁) 纳入本研究。所有患者都是本院眼科门诊的随访患者。纳入标准见后。排除患有糖尿病、高血压、高脂血症、肾脏疾病、冠心病、心衰和肾衰等疾病的患者。所有患者在采集血液样本前都没有接受任何治疗。所有患者都进行了一

系列眼科检查, 包括裂隙灯检查、眼底照相、眼底荧光造影 (Fundus fluorescein angiography, FFA), 吲哚菁绿造影 (Indocyanine green angiography, ICGA) 和 OCT。FFA 和 ICGA 使用共聚焦激光扫描系统 (Spectralis HRA, 德国) 同时进行。

1.1.2 对照组 15 例健康者 (8 例男性; 7 例女性; 年龄 52 ~ 81 岁) 作为对照组, 其与病例组在血压、年龄、身体质量指数 (Body mass index, BMI) 和性别相匹配, 并进行了一些常规身体检查以明确他们均未患有糖尿病、高血压、高脂血症、肝病、肾病和其他代谢性疾病。另外, 他们都没有糖尿病和高血压家族史。所有患者和健康对照者都以书面形式告知并同意参加本研究。本研究得到重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准。研究者连续 2 d 上午对处于静息状态下的所有试验对象使用水银血压计测量血压, 然后将平均值作为每一个体的收缩压和舒张压。

1.2 实验方法

1.2.1 ELISA 法测定血浆 APN 浓度 在隔夜禁食 12 h 后, 抽取 6 ml 静脉血用于测量血浆脂类 (总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白 (High density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein, LDL)、血糖、胰岛素、血浆 APN。多余的血液样本以 1 000 g 离心然后保存在 -20 ℃ 冰箱以备进一步研究。血浆 APN 采用 ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司) 并严格按照内附说明书要求测定, 应用多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 读取结果。胰岛素抵抗使用 HOMA-IR [HOMA-IR = 血糖 (mmol/L) × 胰岛素 (μU/ml) / 22.5] 评估。

1.2.2 Real-time PCR 法检测 PBMC 的 AdipoR mRNA 表达水平 为了研究 APN 信号通路与湿性 AMD 的关系, 测定了 PBMC 的 AdipoR1 和 AdipoR2 mRNA 表达水平。10 ml 血液样本用乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝后再加入 PBS 1:1 稀释。然后加入淋巴细胞分离液 (中国 TBD sciences 公司) 以 800 r/min 离心 25 min 分离 PBMC。细胞总 RNA 使用 RNAiso Plus (中国 Takara 公司) 提取, 接着使用逆转录试剂盒 (中国 Takara 公司) 逆转录为 cDNA 以备定量 PCR 研究。cDNA 采用 Real-time PCR 在 Bio-Rad c-1000 仪器 (美国 Bio-Rad Laboratories) 上进行, 使用的引物如下: 人 AdipoR1: ID (Hs-QRP-35452); 人 AdipoR2: ID (Hs-QRP-37319); GAPDH: ID (Hs-QRP-20169) (美国 GeneCopoeia 公司)。所有引物的特异性已由 GeneCopoeia 公司负责证实。PCR 扩增在 20 μl 体系内加入 all-in-one qPCR Mix (美国 GeneCopoeia 公司) 进行。反应条件如下: 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 10 s 40 个循环, 60 ℃ 20 s, 72 ℃ 15 s。荧光信号在 72 ℃ ~ 95 ℃ 采集, PCR 扩增结束后绘制溶解曲线。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件 (美国 SPSS 公司) 进行分析, 形成的各组计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 Levene's 检验评价变量的分布情况, 病例组和对照组的显著差异性分析采用 *t* 检

验。采用 *Pearson* 相关分析处理两变量相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病例组和对照组的人体测量、临床指标和血浆 APN 浓度

病例组和对照组的人体测量和实验室测量数据见表 1。2 组在年龄、BMI、胰岛素、收缩压和舒张压上的差别无统计学意义。病例组的血糖水平和 HOMA-IR 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 血浆 APN 水平显著低于对照组 ($P = 0.002$, 表 1)。

2.2 病例组和对照组 PBMC 的 AdipoR mRNA 水平

PBMC 的 AdipoR1、AdipoR2 mRNA 水平在 2 组之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 1 病例组和对照组的人体测量、临床指标和血浆 APN 浓度 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Physical index, clinical indicators, plasma adiponection concentration between the case group and the control group ($\bar{x} \pm s$)

指标	病例组 (n = 15)	对照组 (n = 15)	t 值	P 值
性别(男/女)	8/7	8/7		
年龄(岁)	69.07 ± 6.71	64.20 ± 7.46	1.879	0.071
收缩压(mmHg)	129.47 ± 6.82	126.47 ± 9.05	1.025	0.314
舒张压(mmHg)	82.67 ± 6.13	81.47 ± 4.72	0.601	0.553
总胆固醇(mmol/L)	4.86 ± 0.94	4.87 ± 0.98	0.017	0.986
甘油三酯(mmol/L)	1.54 ± 0.65	1.34 ± 0.96	0.663	0.513
LDL(mmol/L)	2.88 ± 0.76	2.77 ± 0.82	0.379	0.708
HDL(mmol/L)	1.43 ± 0.32	1.49 ± 0.34	0.448	0.657
BMI(kg/m ²)	23.68 ± 2.62	23.03 ± 3.13	0.613	0.545
HOMA-IR	1.83 ± 0.91	1.17 ± 0.75	2.159	0.040
胰岛素(μU/ml)	7.42 ± 3.09	5.61 ± 3.93	1.403	0.171
血糖(mmol/L)	5.42 ± 0.64	4.79 ± 0.39	3.253	0.003
血浆 APN(μg/ml)	1.18 ± 0.65	2.00 ± 0.63	3.512	0.002

表 2 病例组和对照组 PBMC 的 AdipoR mRNA 水平
Tab.2 Expressions of AdipoR mRNA in PBMC between the case group and the control group

分组	AdipoR1 mRNA	AdipoR2 mRNA
病例组(n = 15)	1.15 ± 0.75	1.40 ± 1.26
对照组(n = 15)	1.22 ± 0.94	1.39 ± 1.05
t 值	0.208	0.045
P 值	0.837	0.965

2.3 血浆 APN 与其他指标的相关性分析

在病例组中, 血浆 APN 水平与总胆固醇和 LDL 都呈负相关($r = -0.602, P = 0.017$ 和 $r = -0.052, P = 0.046$, 图 1); 在对照组中, 血浆 APN 水平与总胆固醇和 LDL 没有相关性。在 2 组中都没有发现血浆 APN 水平分别与血糖、BMI、胰岛素、

HOMA-IR、其他脂类指标和 AdipoR mRNA 的相关性。

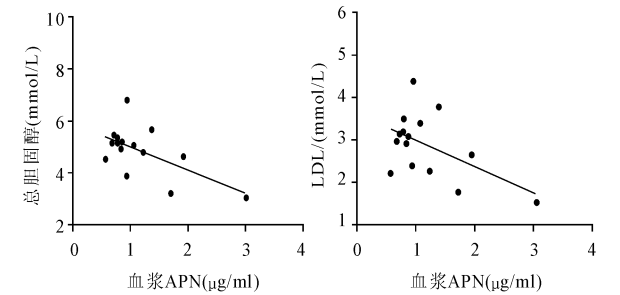


图 1 病例组的血浆 APN 水平与总胆固醇和 LDL 的相关性
Fig.1 Correlations between plasma APN, total cholesterol and LDL in the case group

3 讨 论

有报道发现血浆 APN 水平在增殖性糖尿病视网膜病变的患者中是下降的, 提示 APN 对病理性新生血管的抑制作用^[5]。这与之之前一篇关于前列腺癌的报道一致^[6]。在动物实验中也有类似的发现^[7,8]。在激光诱导的 CNV 小鼠模型中, APN、AdipoR1、AdipoR2 在眼部的表达是增加的, 给予小鼠重组 APN 治疗后, 血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的水平和 CNV 面积大小明显减小^[9]。在另外一种 CNV 实验模型中, 作者证实 APN 通过调节肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抑制由缺氧引起的视网膜血管形成过程^[10]。

本研究的主要发现是湿性 AMD 患者的血浆 APN 水平是下降的。同时发现湿性 AMD 患者存在胰岛素抵抗, 即虽然 2 组的胰岛素水平差别没有统计学意义, 但是血糖和 HOMA-IR 有显著差异。这一结果正好可以支持一个公认的观点: APN 具有胰岛素增敏作用。动物实验的结果证明, APN 是通过增加胰岛素敏感性而不是增加胰岛素表达来降低血糖水平^[13]。而且实验证实 APN 与胰岛素抵抗呈负相关^[14]。与 APN 相关的胰岛素抵抗不仅存在于 2 型糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化中, 还存在于某些恶性肿瘤病变中。有 2 篇报道说明血浆 APN 越低, 发生子宫内膜癌的几率越大, 可能是一个子宫内膜癌的危险因素^[15,16]。还有 2 篇报道称血浆 APN 水平与乳腺癌的发生率呈负相关^[17,18]。综上所述, 与低血浆 APN 水平相关的胰岛素抵抗存在于某些病理性血管新生疾病中, 但与 APN 相关的胰岛素抵抗是否有助于血管形成需要进一步研究。

还发现在湿性 AMD 患者中,血浆 APN 水平与总胆固醇和 LDL 都呈负相关;同样的相关性在对照组中没有发现。此外,在 2 组中都没发现 APN 与胰岛素或者 HOMA-IR 的相关性,这一结果得到了以往研究的证实^[5]。人类试验的证据提示脂代谢紊乱可能存在于湿性 AMD 的病理过程中^[19]。因此,本研究可作为脂代谢紊乱参与湿性 AMD 病理过程的可利证据。

越来越多的证据提示炎症反应和免疫系统在湿性 AMD 的病理过程中起到一定作用,所以我们研究了 PBMC 的 AdipoR mRNA 表达。但是并没有发现 PBMC 的 AdipoR1 和 AdipoR2 mRNA 表达水平在 2 组之间存在显著差异。

本研究同时存在一些不足。首先,有限的病例组决定了本研究不能进一步分析每个指标是否是湿性 AMD 的危险因素。其次,本研究是病例-对照研究,不能确定低血浆 APN 水平是否导致湿性 AMD 的视网膜病变的发生和发展,反之亦然。

总之,本研究的结果提示在与对照组年龄、BMI、性别相匹配的湿性 AMD 患者血浆 APN 水平是下降的。低血浆 APN 水平相关的胰岛素抵抗可能存在于湿性 AMD 的发病机制中,建议可以进行更大样本量的前瞻性研究以明确 APN 在湿性 AMD 病理过程中的真实作用。

参 考 文 献

- [1] Gehrs K M, Anderson D H, Johnson L V, et al. Age-related macular degeneration-emerging pathogenetic and therapeutic concepts[J]. *Ann Med*, 2006, 38(7): 450-471.
- [2] Ambati J, Ambati B K, Yoo S H, et al. Age-related macular degeneration; etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies[J]. *Surv Ophthalmol*, 2003, 48(3): 257-293.
- [3] Yodoi Y, Sasahara M, Kameda T, et al. Circulating hematopoietic stem cells in patients with neovascular age-related macular degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12): 5464-5472.
- [4] Díez J J, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease [J]. *Eur J Endocrinol*, 2003, 148(3): 293-300.
- [5] Yilmaz M I, Sonmez A, Acikel C, et al. Adiponectin may play a part

- in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2004, 151(1): 135-140.
- [6] Serdar G, Mahmut I Y, Kayser C, et al. Prostate cancer and adiponectin[J]. *Urology*, 2005, 65(6): 1168-1172.
- [7] Bora P S, Kaliappan S, Lyzogubov V V, et al. Expression of adiponectin in choroidal tissue and inhibition of laser induced choroidal neovascularization by adiponectin[J]. *Febs Letters*, 2007, 581(10): 1977-1982.
- [8] Akiko H, Koji O, Shinji K, et al. Adiponectin suppresses pathological microvessel formation in retina through modulation of tumor necrosis factor- α expression[J]. *Circ Res*, 2009, 104(9): 1058-1065.
- [9] Ronald K, Michael D K, Barbara E K, et al. Inflammation, complement factor H, and age-related macular degeneration; the multi-ethnic study of atherosclerosis[J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(10): 1742-1749.
- [10] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules; adipocyte-derived plasma protein adiponectin[J]. *Circulation*, 1999, 100(25): 2473-2476.
- [11] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages[J]. *Circulation*, 2001, 103(8): 1057-1063.
- [12] Yvonne Y S, John A C, John J K, et al. Up-regulation of adiponectin, its isoforms and receptors in end-stage kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22(1): 171-178.
- [13] Fruebis J, Tsao T S, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 3kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice [J]. *PNAS*, 2002, 98(4): 2005-2010.
- [14] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity[J]. *Nat Med*, 2001, 7(8): 941-946.
- [15] Petridou E, Mantzoros C, Dessypris N, et al. Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer; a case-control study in Greece [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(3): 993-997.
- [16] Dal M L, Augustin L S, Karalis A, et al. Circulating adiponectin and endometrial cancer risk [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(3): 1160-1163.
- [17] Rose D P, Kominou D, Stephenson G D, et al. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer [J]. *Obes Rev*, 2004, 5(3): 153-165.
- [18] Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, et al. Adiponectin and breast cancer risk [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(3): 1102-1107.
- [19] Crabb J W, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration [J]. *PNAS*, 2002, 99(23): 14682-14687.

(责任编辑:冉明会)