

Dickkopf-3 蛋白在糖尿病视网膜病变患者血浆中的表达

李沐岩¹, 张磊², 张爱华³

基金项目:上海市残疾人康复科研项目资助课题(No. K2014011)

作者单位:¹(200090)中国上海市,同济大学附属杨浦医院眼科;²(200137)中国上海市第七人民医院眼科;³(201700)中国上海市青浦区中心医院眼科

作者简介:李沐岩,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:张磊,博士,硕士研究生导师,主任医师,主任,研究方向:眼底病的临床与基础研究. apple_lsy@163.com

收稿日期:2016-06-12 修回日期:2016-08-23

Study on the expression of Dickkopf-3 protein in diabetic retinopathy

Shu-Yan Li¹, Lei Zhang², Ai-Hua Zhang³

Foundation item: Research Project for Rehabilitation of Disabled People in Shanghai (No. K2014011)

¹Department of Ophthalmology, Yangpu Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Tongji University, Shanghai 200090, China; ²Department of Ophthalmology, the Seventh People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200137, China; ³Department of Ophthalmology, Qingpu District Central Hospital of Shanghai, Shanghai 201700, China

Correspondence to: Lei Zhang. Department of Ophthalmology, the Seventh People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200137, China.

apple_lsy@163.com

Received: 2016-06-12 Accepted: 2016-08-23

Abstract

• AIM: To observe the effects of Dickkopf-3 (Dkk-3) in diabetic retinopathy (DR) circulating blood in patients with the expression level, the Dkk-3 development changes in the diabetic retinopathy of significance in the diagnosis of early DR.

• METHODS: Eighty-five type 2 diabetic patients, included the non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) 23 patients, proliferative diabetic retinopathy, proliferative DR (PDR) in patients with 30 and non-diabetic retinopathy (NDR) with 32 cases. The same period of healthy physical examination was selected as control group (80 cases). Serum samples were collected, and the relative expression level of Dkk-3 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) double antibody sandwich assay. The statistical differences were compared between groups.

• RESULTS: The plasma level of Dkk-3 (430.16 ± 198.11 pg/mL) in DR patients was significantly lower than that in healthy control group (627.48 ± 294.45 pg/mL; $P < 0.05$) and NDR patients (601.99 ± 194.16 pg/mL; $P < 0.05$). While there was no significant difference in Dkk-3

level between NDR and healthy control group ($P = 0.729$). The level of PDR in patients with Dkk-3 (396.38 ± 185.59 pg/mL) was lower than that of NPDR (538.82 ± 187.20 pg/mL; $P = 0.002$).

• CONCLUSION: The decrease of Dkk-3 level may be related to the occurrence and development of diabetic retinopathy, and there is a significant correlation with PDR. Circulating blood Dkk-3 protein in diabetic retinopathy has a certain differential efficacy, it is likely to become diabetic retinopathy patients peripheral blood test indicators.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; Dickkopf-3; circulating

Citation: Li SY, Zhang L, Zhang AH. Study on the expression of Dickkopf-3 protein in diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(10):1891-1893

摘要

目的:观察 Dickkopf-3 在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)患者循环血中的表达水平,研究 Dickkopf-3 在糖尿病视网膜病变发生发展中的变化,探讨其在糖尿病视网膜病变早期诊断中的意义。

方法:选择 2 型糖尿病患者 85 例,其中非增殖期糖尿病视网膜病变(non-proliferative DR, NPDR)患者 23 例、增殖期糖尿病视网膜病变(proliferative DR, PDR)患者 30 例及无视网膜病变(non-diabetic retinopathy, NDR)患者 32 例。选择同期健康体检者为对照组(80 例)。收集血清样本,采用酶联免疫吸附法(ELISA)双抗体夹心法检测循环血中 Dickkopf-3 的相对表达水平,并比较各组血浆 Dickkopf-3 的水平。

结果:糖尿病视网膜病变患者血浆 Dickkopf-3 平均含量为 430.16 ± 198.11 pg/mL,明显低于健康对照组(627.48 ± 294.45 pg/mL)及无视网膜病变患者(601.99 ± 194.16 pg/mL),差异有统计学意义($P < 0.05$);而无视网膜病变与健康对照组 Dickkopf-3 水平比较,差异无统计学意义($P = 0.729$);增殖期糖尿病视网膜病变患者 Dickkopf-3 的水平(396.38 ± 185.59 pg/mL)低于非增殖期糖尿病视网膜病变患者(538.82 ± 187.20 pg/mL),差异有统计学意义($P = 0.002$)。

结论: Dickkopf-3 蛋白水平降低可能与糖尿病视网膜病变的发生发展有关,与增殖期糖尿病视网膜病变有显著相关性。循环血中 Dickkopf-3 蛋白对糖尿病视网膜病变具备一定的鉴别效能,有可能成为糖尿病视网膜病变患者外周血的检测指标。

关键词:糖尿病视网膜病变; Dickkopf-3; 循环血液

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.10.26

引用:李沐岩,张磊,张爱华. Dickkopf-3 蛋白在糖尿病视网膜病变患者血浆中的表达. 国际眼科杂志 2016;16(10):1891-1893

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的微血管并发症,其致病机制十分复杂,视网膜微血管功能障碍是其主要的病变特征。它的病变可累及视网膜、玻璃体,可致牵拉性视网膜脱离出血和新生血管性青光眼以及虹膜红变等严重并发症。若不给予积极治疗,可能迅速进展为增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR),严重影响视力,通常预后不良^[1-2]。近来有研究表明,Dickkopf-3(Dkk-3)与进展中血管生长密度的上调及某些肿瘤生长转移显著相关。它是一种分泌性糖蛋白,是 Dickkopf(Dkk)家族中的一员^[3],表现出一些与其他家族成员不相同的性质,对其生物学功能至今仍然不十分清楚。以往关于 Dkk-3 的研究多局限于肿瘤发生与发展中的作用,随着相关研究的逐步深入,陆续发现其作为分化因子参与肿瘤血管重塑,因而引起广泛关注。因此本研究拟测定 DR 患者相关危险因素及 Dkk-3 的含量,就其差异性变化进行深入探讨,从而为临床诊断提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象

1.1.1 病例选择 选取 2014-10/2015-10 在我院门诊就诊的 2 型 DM 患者 85 例,其中男 43 例,女 42 例,年龄 40~70(平均 56.46±8.66)岁。选择同时期健康体检者为对照组(normal control, NC)80 例,其中男 44 例,女 36 例,年龄 60.24±10.85 岁,双眼散瞳检查眼底为正常。纳入标准:符合 2002 年制定的国际 DR 分级标准;空腹血糖控制在 8mmol/L 以下;签署知情同意书。排除标准:全身感染、肿瘤、合并脑出血或脑梗死、心肌梗死、酮症酸中毒、风湿结缔组织病;屈光间质明显混浊、青光眼、其他的眼内新生血管性疾病、眼部激光及手术史者;近期应用肾毒性药物;其他原因引起的视网膜脉络膜病变。

1.1.2 分组方法 根据散瞳后直接检眼镜、眼底照相或眼底荧光造影检查,按照有无视网膜病变将患者分为三组:无明显视网膜病变 NDR(non-DR, NDR)、非增殖期糖尿病视网膜病变(non-proliferative DR, NPDR)、增殖期糖尿病视网膜病变(proliferative DR, PDR)。NDR 组 32 例,其中男 13 例,女 19 例,年龄 35~65 岁;DR 组 53 例,其中男 30 例,女 23 例,年龄 40~70 岁, NPDR 组 23 例, PDR 组 30 例。各组间年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法 标本采集与测定:采用无抗凝剂干燥试管,抽取空腹静脉血 5mL。30min 内高速离心分离(4000r/min 离心 10min 后,3000r/min 离心 15min)。外周血被分为两层,即血浆层和血细胞层;取上清分装于 Ep 管中,-80℃ 保存。使用血浆时,为避免多次反复冻融,于 4℃ 融解备用。采用酶联免疫吸附法(ELISA)双抗体夹心法测定,使用购买的 Human-Dkk3 Quantikine ELISA 试剂盒,按照试剂盒说明书进行严格操作。

统计学分析:分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析及数据处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组均数的比较采用单因素方差分析,并进行独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

健康对照组、NDR 组和 DR 组血浆 Dkk-3 水平分别为 627.48±294.45、601.99±194.16、430.16±198.11pg/mL。由于 Dkk-3 浓度均呈正态分布(Kolmogorov-Smirnov 检验, $P>0.05$),故这三组间 Dkk-3 水平的比较采用方差分析,结果显示差异具有显著统计学意义($F=7.637, P<0.01$)。两两比较(采用 Tamhane 分析,方差不齐)的结果显示,DR 组的血浆 Dkk-3 水平低于健康对照组及 NDR 组,差异有显著统计学意义($P<0.01$);而 Dkk-3 水平在 NDR 组与健康对照组比较,差异无统计学意义($P=0.729$)。明显视网膜病变中,增殖期糖尿病视网膜病变和非增殖期 Dkk-3 水平分别为 396.38±185.592、538.82±187.20pg/mL, PDR 组的血浆 Dkk-3 水平低于 NPDR 组,差异有显著统计学意义($t=2.466, P=0.002$)。

3 讨论

近年来,糖尿病患病率不断增加,而 DR 作为糖尿病最常见和严重的微血管并发症之一,给个人和社会都带来沉重的经济和社会负担。初次诊断 2 型糖尿病的患者 DR 发生率就可达 12.4%,病程≥15a 视网膜病变的发生危险可高达 78%^[4-5]。早期发现、早期诊断、早期干预,降低糖尿病人群的糖尿病视网膜病变发生几率,减少其对人类健康的影响,降低国家经济负担,已经成为目前世界所面临的新问题。但目前早期诊治方法尚缺乏,深入研究 DR 潜在的发病机制,寻找新的诊治靶点迫在眉睫。

Dkk 家族由 Dkk-1、Dkk-2、Dkk-3、Dkk-4 和 Dkk-5 的相关蛋白 Soggy(Sgy)组成,对细胞的发生、发展、增殖、极性的控制有着非常重要的功能^[6-7]。Wnt 信号通路参与机体的多种病理生理过程,如调控细胞的分化、增殖、凋亡和黏附,调控机体免疫及机体应激等。众多肿瘤的发生与其异常持续性激活相关,特别是上皮性肿瘤的发病过程。Wnt 信号通路的异常激活可诱导包括 VEGF、细胞间黏附分子、肿瘤坏死因子、IL-8、MMP-2、MMP-9 等许多靶基因的表达^[8],它们与炎症及新生血管形成有关,介导炎症过程以及新生血管形成^[9-10]。Dkk-3 是 Wnt 信号通路的拮抗因子,是肿瘤抑制基因,位于人类染色体 11p5.1 的位点,全长约 47 100bp,包含 9 个外显子,2 个启动子,Dkk-3 的起始密码位于第 2 个外显子上。Dkk-3 位于细胞质内,包含 350 个氨基酸,该基因所编码的蛋白可以阻止 Wnt 信号传导通路的途径,其在很多肿瘤组织中的表达均下调,如肾癌^[11]、胃癌^[12]和神经胶质瘤^[13]等。Dkk-3 可能在肿瘤细胞的生长、转移,以及在肿瘤治疗与预后中均起着重要作用。近年有研究表明,在结直肠癌、胃癌^[14]及其癌旁组织中,Dkk-3 阳性样本比阴性样本的平均微血管计数明显多,Dkk-3 的表达阳性样本中也增加,而在正常黏膜样本微血管表现为 Dkk-3 阴性,从而推测 Dkk-3 可能是新生血管形成过程中的一种前血管源性蛋白,或者是一种标记,标记新生血管的形成^[15]。

本研究发现,DR 患者比健康对照组及无视网膜病变的糖尿病患者组血浆 Dkk-3 浓度明显降低。NC 组和 NDR 组患者的 Dkk-3 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。DR 患者中, PDR 组血浆 Dkk-3 水平要低于 NPDR 组。DR 的基本病理学改变是新生血管的形成和血-视网膜屏障的破坏。PDR 是 DR 的发展晚期,伴随视网膜新生血管的形成,易导致玻璃体出血、视网膜脱离。本研究结果表明,Dkk-3 的降低与糖尿病的发生无明显

关系,与PDR的发生有关,提示低水平的Dkk-3可能是PDR发生的高危因素。当Dkk-3降低,糖尿病患者发生PDR的风险升高,两者有显著的关联性。这也说明Dkk-3的降低与眼内新生血管的发生相关。而血浆中的Dkk-3水平的降低是如何参与PDR及新生血管形成,还有待进一步的研究。

糖尿病视网膜病变是非常严重的致盲性眼病,早期的诊断、早期干预非常关键。Dkk-3的测定或许有助于糖尿病视网膜病变的早期诊断及监测病情的发展,或许可以成为一种理想的检查糖尿病视网膜病变的辅助检查方法。

参考文献

- 1 王宁利,李仕明,李文生.我国循证眼科的发展现状、问题及对策.中华眼科杂志 2013;49(5):477-480
- 2 张承芬.眼底病学.北京:人民卫生出版社 1998;701-702
- 3 Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, *et al.* Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 1999;238(2):301-313
- 4 Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, *et al.* Proposed international clinical diabetic Retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003;110(9):1677-1682
- 5 Ding J, Zou Y, Liu N, *et al.* Strategies of digital fundus photography for screening diabetic retinopathy in a diabetic population in urban China. *Ophthalmic Epidemiol* 2012;19(6):414-419
- 6 Veeck J, Dahl E. Targeting the Wnt pathway in cancer; the emerging role of Dickkopf-3. *Biochim Biophys Acta* 2012;1825(1):18-28

- 7 丁振,钱叶本,熊奇如,等. DKK-3 和 WIF-1 基因启动子甲基化状态与肝细胞癌的关系研究. 实用临床医药杂志 2009;13(3):12-15,20
- 8 Masckauchan TN, Shawber CJ, Funahashi Y, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* 2005;8(1):43-51
- 9 Zhou T, Hu Y, Chen Y, *et al.* The pathogenic role of the canonical Wnt pathway in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(9):4371-4379
- 10 Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 2007;26(2):227-239
- 11 Ueno K, Hirata H, Majid S, *et al.* Wnt antagonist DICKKOPF-3(Dkk-3) induces apoptosis in human renal cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2011;50(6):449-457
- 12 徐小燕,夏蒲,邢亚楠,等. 胃癌中 REIC 蛋白分泌水平及其增殖抑制作用研究. 细胞与分子免疫学杂志 2011;27(5):568-570
- 13 De Brouwer S, mestdagh P, Lambertz I, *et al.* Dickkopf-3 is regulated by the MYCN-induced miR-17-92 cluster in neuroblastoma. *Int J Cancer* 2012;130(11):2591-2598
- 14 杨子荣,董卫国,樊利芳,等. 组织芯片检测 Dickkopf-3 在胃癌中的表达及临床意义. 中华消化杂志 2009;29(8):571-573
- 15 Zitt M, Untergasser G, Amberger A, *et al.* Dickkopf-3 as a new potential marker for neoangiogenesis in colorectal cancer; expression in cancer tissue and adjacent non-cancerous tissue. *Dis Markers* 2008;24(2):101-109