

# RBP4 在增生期糖尿病性视网膜病变患者玻璃体中的表达及临床意义

曹天玥, 艾明, 杨红霞, 陈震, 邢怡桥, 江双红

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81600722)

作者单位: (430060) 中国湖北省武汉市, 武汉大学人民医院眼科中心

作者简介: 曹天玥, 武汉大学在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。

通讯作者: 艾明, 毕业于武汉大学, 博士, 主任医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病. [aiminghbwh@163.com](mailto:aiminghbwh@163.com)

收稿日期: 2017-12-12 修回日期: 2018-04-11

## Expression and its clinical significance of RBP4 in vitreous in patients with proliferative diabetic retinopathy

Tian-Yue Cao, Ming Ai, Hong-Xia Yang, Zhen Chen, Yi-Qiao Xing, Shuang-Hong Jiang

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81600722)

Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

**Correspondence to:** Ming Ai. Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. [aiminghbwh@163.com](mailto:aiminghbwh@163.com)

Received: 2017-12-12 Accepted: 2018-04-11

### Abstract

• **AIM:** To observe the concentration of RBP4 and IL-6 in vitreous of proliferative diabetic retinopathy (PDR).

• **METHODS:** A total of 65 patients (66 eyes) were enrolled in Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University from February 2017 to July 2017 with the informed consent. The patients were divided into PDR group (23 cases) and NPDR group (16 cases). Twenty-six patients without diabetic mellitus (DM) served as control group. The demography was matched among the groups, but the course of DM, the blood glucose level and the HbA1c level were elevated in the PDR group and the NPDR group (all  $P < 0.05$ ). Vitreous samples were collected during the procedure of vitrectomy. RBP4, IL-6, TNF- $\alpha$  concentrations in vitreous specimens were detected by ELISA. The differences of vitreous RBP4, IL-6 and TNF- $\alpha$  in various groups were statistically analyzed by ANOVA, respectively. The correlations between RBP4 and IL-6, TNF- $\alpha$  were calculated by Pearson correlation analysis.

• **RESULTS:** The concentration of RBP4 in PDR group, the NPDR group and control group were  $13.68 \pm 2.66$ ,  $11.03 \pm 1.12$ ,  $10.45 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$ , and the concentration of IL-6 were  $56.0 \pm 10.27$ ,  $20.92 \pm 5.77$ ,  $10.26 \pm 1.91 \text{pg/mL}$ . RBP4

and IL-6 concentrations were elevated in PDR group compared with NPDR group and control group, with significant difference among three groups ( $F = 12.135, 161.167$ ;  $P < 0.01$ ). IL-6 concentrations in vitreous increased in the NPDR group in comparison with control group ( $P < 0.05$ ). RBP4 concentrations had no significant difference between the NPDR group and the group ( $P > 0.05$ ). Pearson correlation coefficient was significant positive between RBP4 concentration and IL-6 concentration ( $r = 0.606, P = 0.001$ ).

• **CONCLUSION:** RBP4 is probability involved in the inflammation pathogenesis of PDR. These results indicate that RBP4 could be a new target for the diagnosis and treatment of PDR.

• **KEYWORDS:** RBP4; proliferative diabetic retinopathy; vitreous

**Citation:** Cao TY, Ai M, Yang HX, *et al.* Expression and its clinical significance of RBP4 in vitreous in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(5): 811-814

### 摘要

**目的:** 探讨 RBP4 在增生期糖尿病性视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 炎症反应中的作用。

**方法:** 收集 2017-02/07 在武汉大学人民医院眼科中心就诊患者 65 例 66 眼玻璃体标本, 其中 PDR 组 23 例, 非增生期糖尿病性视网膜病变 (nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR) 组 16 例, 非糖尿病患者 26 例作为对照组。各组患者人口基线特征相匹配, PDR 组及 NPDR 组患者糖尿病病程、血糖水平及糖化血红蛋白水平差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。ELISA 检测各组玻璃体标本中视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的浓度。应用单因素方差分析比较并分析各组玻璃体中 RBP4、IL-6、TNF- $\alpha$  的浓度。采用 Pearson 相关分析法分析 RBP4 与 IL-6 的相关性。

**结果:** RBP4 在 PDR 组、NPDR 组、对照组中浓度分别为  $13.68 \pm 2.66$ 、 $11.03 \pm 1.12$ 、 $10.45 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$ 。IL-6 在 PDR 组、NPDR 组、对照组中浓度分别为  $56.0 \pm 10.27$ 、 $20.92 \pm 5.77$ 、 $10.26 \pm 1.91 \text{pg/mL}$ 。PDR 组中 RBP4、IL-6 浓度明显高于对照组及 NPDR 组, 3 组间总体差异有统计学意义 ( $F = 12.135, 161.167, P < 0.01$ ), NPDR 组玻璃体中 RBP4 浓度与对照组 RBP4 浓度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。NPDR 组玻璃体中 IL-6 浓度较对照组显著升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。玻璃体中 RBP4 浓度与 IL-6 浓度成明显正相关 ( $r = 0.606, P = 0.001$ )。

结论:RBP4可能参与糖尿病性视网膜病变增生期的炎症反应过程,为疾病的诊断与治疗提供新的思路。

关键词:RBP4;增生期糖尿病性视网膜病变;玻璃体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.5.09

引用:曹天玥,艾明,杨红霞,等. RBP4在增生期糖尿病性视网膜病变患者玻璃体中的表达及临床意义. 国际眼科杂志 2018;18(5):811-814

## 0 引言

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)常见的眼部并发症<sup>[1]</sup>,已成为工作人群中主要致盲性疾病<sup>[2]</sup>。其中增生期糖尿病性视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)尤其是伴有新生血管形成的PDR是糖尿病微血管病变最严重的并发症之一,若无有效治疗致盲率近50%<sup>[3]</sup>。至今DR的发病机制尚未完全明了,目前普遍被认为是一种慢性的、持续的、低度的炎症状态的表现<sup>[4]</sup>。视黄醇结合蛋白4(retinol binding protein 4, RBP4)是一种新的循环性脂肪源性因子,也是血液中唯一的维生素A(视黄醇)转运蛋白。RBP4已被证明可诱导胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),且在2型糖尿病血浆中表达水平升高,另外在肥胖症、代谢综合征和心血管疾病患者血浆中,RBP4水平均增高<sup>[5-6]</sup>。Yang等<sup>[7]</sup>在血清学实验中发现,RBP4在IR小鼠及2型糖尿病患者血清中均升高,提示RBP4可能是糖尿病视网膜病变新型的循环标志物。有研究表明RBP4浓度水平的提高可诱导内皮炎症,因此可能在心血管疾病及糖尿病并发症的血管炎症中发挥作用<sup>[8]</sup>。因此,我们研究了RBP4在增生期糖尿病性视网膜病变患者玻璃体中的表达,及与炎症因子IL-6及TNF- $\alpha$ 在PDR患者玻璃体中表达的相关性,探讨RBP4在增生期糖尿病性视网膜病变玻璃体中的表达及临床意义。

## 1 对象和方法

1.1 对象 选取2017-03/07在武汉大学人民医院眼科中心行常规睫状体平坦部标准23G三通道玻璃体切除术患者65例66眼。其中PDR组23例24眼,男12例13眼,女11例11眼;非增生期糖尿病性视网膜病变(nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR)组16例16眼,男9例9眼,女7例7眼;对照组(非糖尿病患者)26例26眼,男12例12眼,女14例14眼。三组患者性别构成比例和年龄差异均无统计学意义( $P>0.05$ ,表1)。PDR组与NPDR组糖尿病病程、血糖水平及糖化血红蛋白水平差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,表1)。所有患者均签署知情同意书,本试验通过武汉大学人民医院临床研究伦理委员会的批准。

1.1.1 纳入标准 (1)病例组符合DR患者诊断标准,并依据2014年中国眼底病学组制定的DR分期标准分为PDR组及非增生期糖尿病性视网膜病变(nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR)组<sup>[9]</sup>;(2)对照组选取因黄斑前膜或黄斑裂孔或黄斑牵拉综合征同时期在同眼科中心行常规23G玻璃体切除术的非糖尿病患者。

1.1.2 排除标准 (1)有眼球穿通伤或眼球钝挫伤病史的患者;(2)既往接受过玻璃体切割手术的患者;(3)近期眼部急性炎症如感染性角膜炎、角膜溃疡、慢性泪囊炎等

患者;(4)长期接受眼部局部或全身类固醇治疗的患者;(5)排除尿毒症患者;(6)对照组还需排除糖尿病、高血压、高血脂慢性疾病病史。

## 1.2 方法

1.2.1 标本采集 术前散瞳,术中球后麻醉,做常规睫状体平坦部23G三切口,颞下方预置灌注头,玻璃体切割头及导光照明纤维进入眼内,玻切头切取稀释的中央玻璃体液0.12~0.2mL于1mL无菌注射器中,随即打开眼内灌注继续手术,将玻璃体转移至消毒后的EP管立即置于半径为12cm离心机中,在4℃,12000r/min条件下离心10min,取上清液后存放于-80℃冰箱保存,备用。

1.2.2 RBP4、IL-6、TNF- $\alpha$ 质量浓度测量 ELISA法检测玻璃体中RBP4、IL-6、TNF- $\alpha$ 浓度。采用人RBP4、IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),实验前将试剂和待测样本置于室温20℃~28℃中平衡20min,在酶标包被板上设8个标准孔,在第1孔中加入标准品100 $\mu$ L,然后在第1孔加入标准品稀释液50 $\mu$ L,混匀;从第1孔取100 $\mu$ L加到第2孔,再在第2孔加50 $\mu$ L标准品稀释液,混匀;依次稀释至第8孔取50 $\mu$ L弃去。分别设空白孔、待测样品孔,在酶标包被板上加待测样品50 $\mu$ L,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体100 $\mu$ L,用封板膜封住反应孔,37℃恒温箱温育60min。弃液,吸水纸上拍干,每孔加洗涤液(350 $\mu$ L),静置1min,弃液,吸水纸上拍干,如此重复洗板5次,充分弃尽孔内液体并控干孔内剩余残液,每孔加入酶标试剂50 $\mu$ L。每孔先加显色剂A,再加入显色剂B各50 $\mu$ L,稍轻微震荡,37℃避光显色15min。每孔加终止液50 $\mu$ L终止反应。以空白孔调零,使用全自动酶标仪在450nm下读取吸光度(OD)值。另设一个空白对照孔,仅于孵育后加入显色剂A、B反应,反应过后加入终止液后读取OD值。根据不同浓度标准品所测的OD值绘制标准曲线。在标准曲线图上根据每个待测样本的OD值再找出其相对应的浓度,记录实验数据。

统计学分析:采用SPSS 22.0统计学软件对结果进行统计分析。本研究各检测指标的数据资料经Shapiro-Wilk检验呈正态分布,以均数 $\pm$ 标准差进行描述,各组间均数经Levene检验,均 $P>0.05$ 。采用均衡分组单因素3水平试验设计。RBP4与其它细胞因子的相关性进行Pearson相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组患者玻璃体中RBP4浓度比较 采用ELISA方法检测PDR组、NPDR组和对照组中RBP4浓度,分别为13.68 $\pm$ 2.66、11.03 $\pm$ 1.12、10.45 $\pm$ 1.17 $\mu$ g/mL。PDR组玻璃体中RBP4浓度明显高于NPDR组及对照组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图1)。NPDR组玻璃体中RBP4浓度与对照组间RBP4浓度差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.2 各组患者玻璃体中IL-6及TNF- $\alpha$ 浓度比较 采用ELISA检测PDR组、NPDR组和对照组中IL-6浓度,分别为56.0 $\pm$ 10.27、20.92 $\pm$ 5.77、10.26 $\pm$ 1.91pg/mL,IL-6浓度依次降低,差异具有统计学意义( $F=161.167, P<0.01$ )。PDR组玻璃体中IL-6浓度明显高于NPDR组及对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),NPDR组玻璃体中IL-6浓度较对照组显著升高,差异具有统计学意义

表1 武汉大学人民医院眼科中心纳入的各组患者基线基本特征

组别	眼数	年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)	性别		DM 病程( $\bar{x}\pm s$ ,a)	血糖水平( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	HbA1c( $\bar{x}\pm s$ ,%)
			男	女			
PDR 组	24	51.3 $\pm$ 10.1	13	11	9.9 $\pm$ 5.2	7.3 $\pm$ 2.1	8.0 $\pm$ 1.0
NPDR 组	16	55.1 $\pm$ 8.9	9	7	5.0 $\pm$ 4.2	6.23 $\pm$ 0.9	5.6 $\pm$ 0.7
对照组	26	55.6 $\pm$ 6.9	12	14		5.2 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 0.5
<i>P</i>		0.189	0.806		0.001	0.032	<0.01

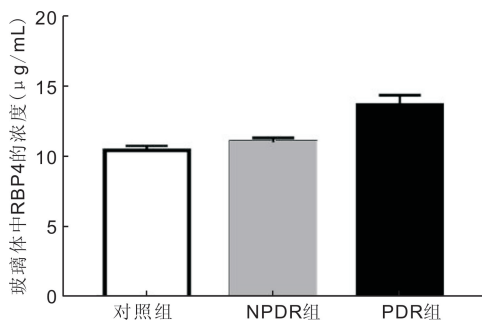


图1 PDR组、NPDR组和对照组中玻璃体中RBP4浓度。

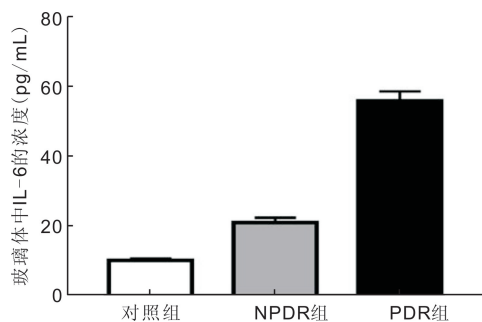


图2 PDR组、NPDR组和对照组玻璃体中IL-6浓度。

( $P < 0.05$ ), 见图2。采用ELISA检测玻璃体中PDR组、NPDR组和对照组中TNF- $\alpha$ 浓度,分别为 $6.80 \pm 1.9$ 、 $5.86 \pm 1.49$ 、 $7.02 \pm 1.82$ pg/mL。各组间玻璃体TNF- $\alpha$ 浓度差异无统计学意义( $F = 0.898$ ,  $P > 0.05$ , 图3)。

**2.3 PDR组玻璃体中RBP4与IL-6、TNF- $\alpha$ 浓度的回归相关性分析** Pearson相关性分析结果提示,PDR组玻璃体中RBP4浓度与玻璃体中IL-6浓度呈明显线性正相关( $r = 0.606$ ,  $P = 0.001$ ),见图4。表明PDR患者玻璃体中IL-6浓度的升高与RBP4的浓度升高有关。而PDR组玻璃体中RBP4浓度与玻璃体中TNF- $\alpha$ 浓度则无明显线性相关( $r = 0.013$ ,  $P = 0.934$ )。

### 3 讨论

DR是糖尿病最严重的微血管并发症,其特征性病理改变为血管通透性增加、血管微动脉瘤形成、新生血管形成和纤维血管组织增生<sup>[1]</sup>。慢性炎症是DR重要的发病机制,但炎症进程的确切机制及作用时间仍未明确。

目前,RBP4被认为是与胰岛素抵抗、肥胖、2型糖尿病均相关的一种新型脂肪因子,主要由肝脏及脂肪组织分泌<sup>[10]</sup>。临床研究表明血浆RBP4浓度升高与血管炎症相关,也有临床试验结果表明RBP4在PDR患者血浆及尿中表达均升高,提示RBP4可能为DR诊断的新型标志物<sup>[11]</sup>。IL-6是由T细胞、B细胞、单核细胞等产生,参与调控炎症、免疫反应及损伤修复过程,并且在胰岛素抵抗中IL-6也发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。本试验确切地证实了RBP4在PDR患者眼部中存在着高表达,实验结果表明

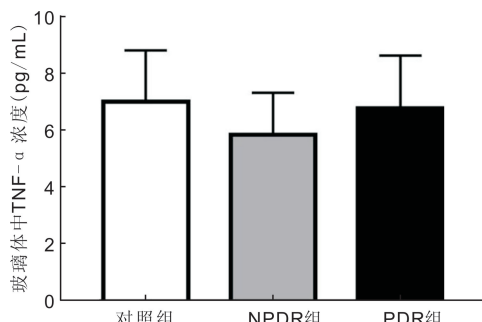
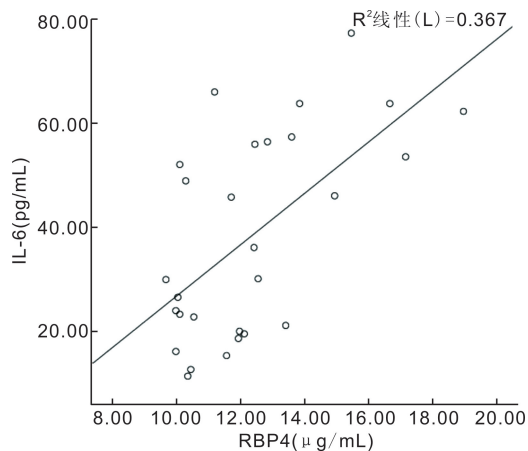
图3 PDR组、NPDR组和对照组玻璃体中TNF- $\alpha$ 浓度。

图4 PDR组玻璃体中RBP4浓度与IL-6浓度的相关性分析。

RBP4在PDR患者玻璃体中浓度明显高于无糖尿病的对照患者,说明RBP4参与了DR的病情进展,且RBP4在PDR患者玻璃体中浓度明显高于NPDR患者,说明RBP4可能主要是在DR增生期病变过程中发挥作用。而IL-6浓度在PDR患者玻璃体中升高,在PDR组、NPDR组及对照组玻璃体中IL-6浓度依次降低,直观地说明了IL-6参与了DR发病及病情进展,可能与其致炎及使血管内皮功能障碍相关<sup>[13-14]</sup>,此结果与既往试验结果相一致<sup>[15-17]</sup>。

相关性试验结果提示在DR中晚期玻璃体中IL-6浓度受RBP4浓度的影响。既往有研究报道指出RBP4可直接与膜受体维甲酸诱导蛋白6(STRA4)结合,激活内皮细胞NADPH氧化酶产生自由基超氧化物,继而通过生成活性氧簇而促进促炎细胞的信号转导<sup>[18]</sup>,诱导促进基因表达的转录因子核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达,进而促进白细胞聚集、黏附因子及IL-6的产生<sup>[8,19]</sup>。另有大鼠实验报道RBP4诱导的炎症主要由TLR4介导,增加p38和c-Jun N-末端蛋白激酶(JNK)的磷酸化活性,继而刺激血管细胞黏附分子1(VCAM-1)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)和IL-6等因子的产生<sup>[20]</sup>。因此推测RBP4可能通过上述机制而影响IL-6表达,进而参与DR中晚期炎症反应过程。

TNF- $\alpha$ 可由单核巨噬细胞及血管内皮细胞产生,既可引起血管内皮功能紊乱及微血管的病变,还可通过增加活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产物产生而诱导炎症反应<sup>[21-22]</sup>。本次试验结果中,TNF- $\alpha$ 在PDR组、NPDR组及对照组间浓度并无明显差异,此结果与2001年Yuuki等<sup>[16]</sup>及2013年Gustavsson等<sup>[14]</sup>试验结果相一致,但与2008年Adamiec-Mroczek等<sup>[23]</sup>的结果相悖。可能TNF- $\alpha$ 仅参与DR病程外周血病理改变而不参与眼内病变<sup>[24]</sup>,此原因需要更多大样本试验进行进一步的研究。

综上所述,本试验证明随着DR病情进展,RBP4在PDR患者玻璃体中浓度明显高于NPDR患者,且RBP4浓度变化与IL-6浓度变化有明显相关性,这说明RBP4可能参与糖尿病视网膜病变增生期的炎症反应过程。本研究结果提示RBP4可能为PDR的诊断与治疗提供新的思路。

#### 参考文献

- 1 Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2012;366(13):1227-1239
- 2 Fong DS, Aiello LP, Ferris FL 3rd, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004;27(10):2540-2553
- 3 Aiello LP. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2005;353(8):839-841
- 4 Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* 2002;86(4):363-365
- 5 Simó-Servat O, Simó R, Hernández C. Circulating biomarkers of diabetic retinopathy: an overview based on physiopathology. *J Diabetes Res* 2016;2016:5263798
- 6 Christou GA, Tselepis AD, Kiortsis DN. The metabolic role of retinol binding protein 4: an update. *Horm Metab Res* 2012;44(1):6-14
- 7 Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436(7049):356-362
- 8 Farjo KM, Farjo RA, Halsey S, et al. Retinol-binding protein 4 induces inflammation in human endothelial cells by an NADPH oxidase- and nuclear factor kappa B-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 2012;32(24):5103-5115
- 9 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014年). *中华眼科杂志* 2014;50(11):851-865
- 10 Christou GA, Tselepis AD, Kiortsis DN. The Metabolic Role of Retinol Binding Protein 4: An Update. *Horm Metab Res* 2012;44(1):6-14

- 11 Li Z, Lu X, Liu J, et al. Serum retinol-binding protein 4 levels in patients with diabetic retinopathy. *J Int Med Res* 2010;38(1):95-99
- 12 Yoshida S, Kubo Y, Kobayashi Y, et al. Increased vitreous concentrations of MCP-1 and IL-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: possible association with postoperative macular oedema. *Br J Ophthalmol* 2015;99(7):960-966
- 13 Zhou J, Wang S, Xia X. Role of intravitreal inflammatory cytokines and angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2012;37(5):416-420
- 14 Gustavsson C, Agardh CD, Agardh E. Profile of intraocular tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in diabetic subjects with different degrees of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2013;91(5):445-452
- 15 Vujosevic S, Simo R. Local and Systemic Inflammatory Biomarkers of Diabetic Retinopathy: An Integrative Approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(6):68-75
- 16 Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, et al. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. *J Diabetes Complications* 2001;15(5):257-259
- 17 Suzuki Y, Nakazawa M, Suzuki K, et al. Expression profiles of cytokines and chemokines in vitreous fluid in diabetic retinopathy and central retinal vein occlusion. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55(3):256-263
- 18 李宏哲,李才锐,孙曙光. IL-6基因启动子区-572 C/G多态性与大理白族2型糖尿病视网膜病变的关系. *国际眼科杂志* 2017;17(3):444-448
- 19 Du M, Martin A, Hays F, et al. Serum retinol-binding protein-induced endothelial inflammation is mediated through the activation of toll-like receptor 4. *Mol Vis* 2017;23:185
- 20 Farje K, Farjo R, Halsey S, et al. Retinol-binding protein 4 induces inflammation in human endothelial cells by an NADPH oxidase- and nuclear factor kappa B-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 2012;32(24):5103-5115
- 21 Bertazza L, Mocellin S. Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Front Biosci* 2008;13:2736-2743
- 22 Gustavsson C, Agardh CD, Hagert P, et al. Inflammatory markers in nondiabetic and diabetic rat retinas exposed to ischemia followed by reperfusion. *Retina* 2008;28(4):645-652
- 23 Adamiec-Mroczek J, Oficjalska-Mlynczak J. Assessment of selected adhesion molecule and proinflammatory cytokine levels in the vitreous body of patients with type 2 diabetes--role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(12):1665-1670
- 24 姜文敏,唐罗生. TNF与糖尿病视网膜病变. *国际眼科杂志* 2007;7(2):481-484