

# BMP-6 与新生血管性年龄相关性黄斑变性的相关性

陈丽<sup>1</sup>, 郝杨<sup>1</sup>, 张智超<sup>2</sup>, 刘明<sup>3</sup>

**基金项目:**陕西省社会发展科技攻关项目(No. 2016SF-257)  
**作者单位:**<sup>1</sup>(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学医学院第一附属医院眼科;<sup>2</sup>(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学医学院神经生物研究所;<sup>3</sup>(710061)中国陕西省西安市第一医院眼科  
**作者简介:**陈丽,在读博士研究生,主治医师,研究方向:黄斑部疾病。  
**通讯作者:**刘明,毕业于西安交通大学,副主任医师,研究方向:玻璃体视网膜病变。liuming24900@163.com  
**收稿日期:**2018-05-02 **修回日期:**2018-09-17

## Correlation analysis of BMP-6 and age-related neovascular macular degeneration

Li Chen<sup>1</sup>, Yang Hao<sup>1</sup>, Zhi-Chao Zhang<sup>2</sup>, Ming Liu<sup>3</sup>

**Foundation item:** Shaanxi Science and Technology Development Research Project (No. 2016SF-257)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Institute of Neurobiology, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Ming Liu. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. liuming24900@163.com

Received:2018-05-02 Accepted:2018-09-17

## Abstract

• **AIM:** To investigate the correlations between aqueous concentrations of bone morphogenetic protein 6 (BMP-6), interleukin 6 (IL-6), and vascular endothelial growth factor (VEGF) and the parameters of macular edema acquired by optical coherence tomography (OCT) in patients with neovascular age-related macular degeneration (nARMD).

• **METHODS:** Totally 35 eyes from 34 patients with nARMD were studied. Twenty eyes from 20 patients with no retinal pathology who underwent cataract surgery served as controls. The central subfield macular thickness (CSMT) of nARMD within 1 mm was measured with OCT. Aqueous humor samples were collected just before intravitreal ranibizumab injection in 35 eyes with nARMD and before cataract surgery in 20 control eyes. Concentration of BMP-6 were determined by ELISA. IL-6, VEGF were measured by cytometric bead array (CBA).

• **RESULTS:** The level of BMP-6 in aqueous humor of patients with nARMD ( $35.29 \pm 4.27$  pg/mL) was significantly lower than that of control eyes ( $62.04 \pm 2.78$  pg/mL,  $P < 0.05$ ), while VEGF level was  $93.13 \pm 47.25$  pg/mL, significantly higher than that of the control group  $69.21 \pm 13.40$  pg/mL ( $P < 0.05$ ). The level of IL-6 was not significantly different between the two groups. BMP-6 was negatively correlated with CSMT ( $r = -0.409$ ,  $P = 0.015$ ).

• **CONCLUSION:** Aqueous humor concentrations of BMP-6 are decreased in eyes with nARMD. Aqueous humor concentrations of VEGF are elevated in eyes with nARMD. BMP-6 could be associated with the pathogenesis of nARMD.

• **KEYWORDS:** bone morphogenetic protein 6; neovascular age-related macular degeneration; interleukin 6; vascular endothelial growth factor; central subfield macular thickness

**Citation:** Chen L, Hao Y, Zhang ZC, et al. Correlation analysis of BMP-6 and age-related neovascular macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(11):2092-2095

## 摘要

**目的:**探讨新生血管性年龄相关性黄斑变性(nARMD)患者房水中骨形态发生蛋白6(BMP-6)、白细胞介素-6(IL-6)及血管内皮生长因子(VEGF)的变化及其与黄斑区视网膜厚度的相关性。

**方法:**收集2015-06/2017-03于我院眼科就诊的nARMD患者34例35眼作为nARMD组,选取同期于我院住院行白内障手术的年龄相关性白内障患者20例20眼作为对照组。采用光学相干断层扫描(OCT)测量两组患者黄斑区1mm范围内的平均视网膜厚度(CSMT)。通过ELISA法检测房水中BMP-6的浓度,流式微球技术(CBA)测量IL-6和VEGF的浓度。

**结果:**nARMD组患者房水中BMP-6水平( $35.29 \pm 4.27$  pg/mL)明显低于对照组( $62.04 \pm 2.78$  pg/mL),而VEGF水平( $93.13 \pm 47.25$  pg/mL)明显高于对照组( $69.21 \pm 13.40$  pg/mL),差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),两组患者房水中IL-6的水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。Spearman相关性分析表明,nARMD组患者房水中BMP-6含量与CSMT呈负相关( $r_s = -0.409$ ,  $P = 0.015$ )。

**结论:**nARMD患眼房水中BMP-6浓度下降,而VEGF浓度升高,BMP-6含量与CSMT呈负相关,其可能参与nARMD的发病过程。

**关键词:**骨形态发生蛋白-6;新生血管性年龄相关性黄斑变性;白细胞介素-6;血管内皮生长因子;黄斑区视网膜厚度

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.11.36

引用:陈丽,郝杨,张智超,等. BMP-6与新生血管性年龄相关性黄斑变性的相关性. 国际眼科杂志 2018;18(11):2092-2095

## 0 引言

新生血管性年龄相关性黄斑变性(nARMD)可以导致中心视力丧失,是世界上老年人致盲的主要原因。到目前为止,年龄相关性黄斑变性(ARMD)的发病原因尚不明确。越来越多的研究表明,氧化应激以及铁导致的毒性作用参与了黄斑变性的发病过程<sup>[1]</sup>。骨形态发生蛋白6(bone morphogenetic protein-6, BMP-6)是转化生长因子家族成员,在眼部组织中可以发现 BMP-6 的表达,其在眼组织的发育和分化中起到很重要的作用。尸检发现,早期 ARMD 患者视网膜色素上皮(RPE)细胞中 BMP-6 的水平明显下降<sup>[2]</sup>。BMP-6 是体内调节铁平衡的关键调节因子,通过调节铁代谢进而调节氧化应激,从而在 ARMD 的发病过程中发挥作用。本研究旨在观察 nARMD 患者房水中与铁代谢相关的因子 BMP-6、白细胞介素-6(IL-6)及血管内皮生长因子(VEGF)的变化,分析其与黄斑区视网膜厚度的相关性,进一步探讨 nARMD 发病的可能机制。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 收集 2015-06/2017-03 于西安交通大学第一附属医院眼科就诊的 nARMD 患者 34 例 35 眼作为 nARMD 组,选取同期于我院住院行白内障手术的年龄相关性白内障患者 20 例 20 眼作为对照组。纳入标准:(1) nARMD 组:1) 光学相干断层扫描(OCT)及眼底荧光造影检查确诊为 nARMD;2) 首次行玻璃体腔注射抗 VEGF(雷珠单抗或者贝伐单抗)药物治疗者。(2) 对照组:确诊为年龄相关性白内障,影响视力拟行白内障手术者。排除标准:(1) 全身慢性系统性疾病(如糖尿病、心脏病、肝脏急慢性疾病、肺部感染、尿路感染、脑血管疾病)者;(2) 既往有糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞、青光眼、视神经病变等其它眼部疾病者;(3) 对照组排除 ARMD 者。两组患者性别构成比、年龄和眼内压(IOP)等一般资料比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ,表 1);术前最佳矫正视力(BCVA)差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。本研究通过西安交通大学第一附属医院伦理委员会认证,所有患者都自愿加入本研究,并签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 平均视网膜厚度测定** 术前所有患者均通过 OCT(Cirrus TMHD-OCT 4000)检查在 Cube 模式下检测黄斑区 1mm 范围内的平均视网膜厚度(central subfield macular thickness, CSMT),扫描速度为 27000 A 扫描/s,扫描区域为 6.0mm×6.0mm,扫描模式为 512×128,探测深度为 2mm,轴向分辨率为 5 $\mu$ m,水平分辨率<15 $\mu$ m。根据患者视力情况采用内注视或外注视,信号强度>5 格为纳入标准,OCT 自动测定黄斑区内九分区的视网膜厚度,中央圆环为黄斑中心凹 1mm 内的平均视网膜厚度(图 1)。

## 1.2.2 房水中细胞因子的检测

**1.2.2.1 样本采集** nARMD 组患者在首次进行玻璃体腔注射抗 VEGF 药物时抽取房水,常规表面麻醉后消毒

铺巾,冲洗结膜囊后用 1mL 空针 30G 针头抽取前房房水约 0.15~0.2mL,再行玻璃体腔注射抗 VEGF 药物注射。对照组患者在白内障手术过程中抽取房水,常规表面麻醉后消毒铺巾,冲洗结膜囊后,先做白内障辅助切口,用 1mL 空针 30G 针头抽取前房房水约 0.15~0.2mL,再由侧切口注入黏弹剂形成前房,行主切口,常规行超声乳化晶状体摘除联合人工晶状体植入术。收集的房水标本置于 EP 管中于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

**1.2.2.2 标本检测** 采用 ELISA 法检测房水中 BMP-6 的含量,按照试剂盒(R&D Systems, USA)说明书的操作要求取 0.1mL 样本进行测定,使用酶标仪(SS228BEPHII, 北京)检测 450nm 处每个检测孔的光密度值,并参照标准曲线计算 BMP-6 的浓度。采用流式微球检测(cytometric bead array, CBA)技术测量 IL-6 和 VEGF 的浓度。CBA 是一种基于流式细胞检测系统的多重蛋白定量检测方法,它可同时对单个样品中的多个指标进行检测。本研究使用 50 $\mu$ L 样本根据 CBA 试剂盒(美国 BD 公司)说明书进行操作,在流式细胞仪(Facs cell Scale bar BD, USA)上检测房水中 IL-6 和 VEGF 的浓度。

统计学分析:采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料采用率表示,组间比较采用卡方检验。相关性分析采用 Spearman 相关性分析法。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组患者房水中细胞因子的含量** nARMD 组患者房水中 BMP-6 浓度明显低于对照组,VEGF 浓度明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。两组患者房水中 IL-6 浓度比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ,表 2)。

**2.2 CSMT 与房水中细胞因子含量的相关性分析** 本研究中, nARMD 组患者 CSMT 为 408.14 $\pm$ 144.63 $\mu$ m,对照组患者 CSMT 为 227.9 $\pm$ 20.98 $\mu$ m,差异有统计学意义( $t=7.295, P<0.001$ )。Spearman 相关性分析表明, nARMD 组患者房水中 BMP-6 含量与 CSMT 呈负相关关系( $r_s=-0.409, P=0.015$ ), VEGF 和 IL-6 含量分别与 CSMT 具有一定的正相关和负相关趋势,但差异均无统计学意义( $r_s=0.314, -0.04, P=0.066, 0.822$ )。此外, nARMD 患者房水中 BMP-6 含量与 VEGF 和 IL-6 含量无相关性( $r_s=-0.006, 0.133, P=0.974, 0.446$ ), VEGF 和 IL-6 含量亦无相关性( $r_s=0.192, P=0.269$ )。

## 3 讨论

本研究通过观察 nARMD 患者及年龄相关性白内障患者房水中 BMP-6、IL-6 及 VEGF 的表达水平,并分析上述细胞因子与黄斑区视网膜厚度的相关性,结果显示, nARMD 患者房水中 BMP-6 水平明显降低, VEGF 的水平较对照组明显升高,而 IL-6 的水平较对照组无明显差异。其中, BMP-6 水平与黄斑区视网膜厚度呈负相关,而 VEGF 及 IL-6 水平与黄斑区视网膜厚度无明显的相关性。

近年来,铁代谢已成为 ARMD 病理机制研究的新靶点。铁调素是由肝脏合成并分泌的富含半胱氨酸的抗菌多肽。我们前期研究发现,氧化应激可以通过调节铁调素及铁的代谢起到氧化损伤作用<sup>[3]</sup>。Pigeon 等<sup>[4]</sup>首次证

表1 两组患者一般资料的比较

组别	例数/眼数	男/女(例)	年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)	高血压病史 (例,%)	术前 BCVA ( $\bar{x}\pm s$ ,LogMAR)	术前 IOP ( $\bar{x}\pm s$ ,mmHg)
nARMD 组	34/35	18/16	67.17±9.02	8(24)	1.17±0.79	13.97±2.60
对照组	20/20	9/11	70.2±11.12	5(25)	0.75±0.42	15.05±3.26
$t/\chi^2$		0.079	-1.100	0.042	2.263	-1.287
<i>P</i>		0.778	0.126	0.838	0.028	0.667

注:对照组:年龄相关性白内障患者。



图1 采用 OCT 测定平均视网膜厚度。

表2 两组患者房水中 BMP-6、VEGF 及 IL-6 含量的比较

组别	( $\bar{x}\pm s$ ,pg/mL)		
	BMP-6	VEGF	IL-6
nARMD 组	35.29±4.27	93.13±47.25	9.94±2.74
对照组	62.04±2.78	69.21±13.40	9.32±2.25
<i>t</i>	-28.04	2.805	0.917
<i>P</i>	0.017	<0.01	0.176

注:对照组:年龄相关性白内障患者。

实铁素与机体铁代谢密切相关,是一种重要的负性铁调节激素。BMP-6 敲除小鼠肝脏中表现出铁集聚<sup>[5]</sup>。BMP-6 敲除小鼠表现为年龄相关性铁积聚及视网膜变性<sup>[6]</sup>。在鼠眼内进行 BMP-6 蛋白注射,可以上调铁素进而改变视网膜中铁的水平。提示 BMP-6 可通过铁素调控铁代谢,进而在 ARMD 的发展中发挥很重要的作用。本课题组前期研究发现,BMP-6 可以减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对体外培养的 RPE 细胞的损伤<sup>[7]</sup>。BMP-6 可以调节 RPE 细胞基质金属蛋白酶(MMPs)/金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的平衡<sup>[8]</sup>。Hadziahmetovic 等<sup>[9]</sup>研究 BMP-6 在视网膜铁调节和 ARMD 发病机制中的作用,发现氧化应激可以下调 BMP-6 的活性进而在黄斑变性的发病中起作用,并且在早期 ARMD 患者中亦发现 BMP-6 水平降低。本次研究提示,nARMD 患者房水中 BMP-6 水平明显降低,进一步验证了 BMP-6 在 nARMD 的发病过程中起着重要的作用。我们进一步分析发现,BMP-6 与黄斑区视网膜厚度具有一定的负相关性。

铁素在体内表达的调控机制非常复杂,其中 BMP-Smad 通路被认为是调节铁素基础表达的核心通路<sup>[10]</sup>。机体发生炎症或感染时,IL-6 可以促进铁素的表达<sup>[11]</sup>,而 BMP-Smad 通路特异性阻断剂能够抑制该过程<sup>[12]</sup>。因此,BMP-Smad 通路可能参与 IL-6 调控铁素表达的过程。研究发现,BMP-6 可以在巨噬细胞中促进

IL-6 表达<sup>[13]</sup>。基于此,我们进一步观察 nARMD 患者房水中 IL-6 的水平,并观察其与 BMP-6 是否具有相关性,结果提示,nARMD 患者房水中 IL-6 的水平与对照组无明显差异,这与之前的研究结果一致<sup>[14]</sup>。当然,也有研究发现 IL-6 的水平明显升高<sup>[15-16]</sup>。同时,本研究发现,BMP-6 与 IL-6 呈一定的正相关,但差异无统计学意义,仍需进一步探索 BMP-6 和 IL-6 在 nARMD 中的变化。

VEGF 是很重要的促血管生成细胞因子,其过度表达不但能增加血管渗透性,而且直接刺激血管内皮细胞生长和新生血管生成,是目前 nARMD 抗 VEGF 治疗的靶点。有关 VEGF 在 nARMD 患者房水的表达,报道不一。本研究发现,nARMD 患者房水中 VEGF 水平较对照组升高,这与既往研究结果一致<sup>[17]</sup>。我们进一步分析 VEGF 与黄斑区视网膜厚度的相关性,结果显示,VEGF 与黄斑区视网膜厚度无明显的相关性。有学者通过匹配患者眼轴后发现,nARMD 患者房水中 VEGF 水平与对照组相比无明显差异<sup>[14]</sup>,这与本研究结果一致。本研究中未能匹配患者的眼轴,结果具有一定的局限性。研究证实,IL-6 可以诱导 VEGF 产生,通过促进 VEGF 的表达促进新生血管的生成。我们观察 nARMD 患者房水中 IL-6 与 VEGF 的相关性发现,IL-6 与 VEGF 无相关性,且 VEGF、IL-6 与 CSMT 均无明显的相关性,进一步分析发现,BMP-6 与 VEGF 呈现一定的负相关趋势,但无统计学意义。骨形成过程中,VEGF 和 BMP-6 联合通过增强血管生成进而显著增强骨修复作用<sup>[18]</sup>。Arjunan 等<sup>[19]</sup>发现,将 RPE 细胞暴露于过量的铁环境中可以激活 BMP-6 的信号通路,进而增加 VEGF 表达。BMP-6 与 VEGF 的具体相关性有待进一步探讨。

综上所述,本研究通过观察 nARMD 患者房水中相关细胞因子的表达水平,并分析其与黄斑区视网膜厚度的相关性,发现 BMP-6 在 nARMD 患者房水中的表达明显下降,且其与 CSMT 呈负相关。结合既往细胞学方面的研究结果<sup>[7-8]</sup>,认为 BMP-6 可以作为探讨 ARMD 发病机制及治疗的新的研究靶点。本研究具有一定的局限性:(1) 样本量不够大,结果具有一定的局限性;(2) 未进行眼轴方面的具体匹配;(3) 房水标本的诊断价值可能不如玻璃体标本高,然而对于 nARMD 患者而言多数情况下是不需要进行玻璃体切除术的,故获取玻璃体样本具有一定难度。

参考文献

- Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med* 2008;14(2):194-198
- Meynard D, Kautz L, Darnaud V, et al. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 2009;41(4):478-481



- 3 刘明,龙潭,崔丽珺,等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对体外培养的视网膜色素上皮细胞中铁及铁调素的影响. 眼科新进展 2016;36(8):705-708
- 4 Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, *et al.* A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276(11):7811-7819
- 5 Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, *et al.* BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 2009;41(4):482-487
- 6 Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, *et al.* BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104(51):20380-20385
- 7 陈丽,刘明,刘勇,等. 骨形态发生蛋白-6 对过氧化氢造成的视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用的实验研究. 国际眼科杂志 2016;16(1):37-40
- 8 陈丽,刘明,刘勇. BMP-6 对氧化应激状态下的视网膜色素上皮细胞基质金属蛋白酶及其抑制剂的影响. 眼科新进展 2015;35(11):1017-1020
- 9 Hadziahmetovic M, Song Y, Wolkow N, *et al.* Bmp6 regulates retinal iron homeostasis and has altered expression in age-related macular degeneration. *Am J Pathol* 2011;179(1):335-348
- 10 Coh JB, Wallace DF, Hong W, *et al.* Endofin, a novel BMP-SMAD regulator of the iron-regulatory hormone, hepcidin. *Sci Rep* 2015;5:13986
- 11 Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006;108(9):3204-3209
- 12 Paul BY, Hong CC, Sachidanandan C, *et al.* Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 2008;4(1):33-41
- 13 Lee GT, Kwon SJ, Lee JH, *et al.* Induction of interleukin-6 expression by bone morphogenetic protein-6 in macrophages requires both SMAD and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* 2010;285(50):39401-39408
- 14 Sakurada Y, Nakamura Y, Yoneyama S, *et al.* Aqueous humor cytokine levels in patients with polypoidal choroidal vasculopathy and neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* 2015;53(1):2-7
- 15 Miao H, Tao Y, Li XX. Inflammatory cytokines in aqueous humor of patients with choroidal neovascularization. *Mol Vis* 2012;18:574-580
- 16 Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, *et al.* Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2012;90(5):e381-388
- 17 Heimes B, Lommatzsch A, Zeimer M, *et al.* Anti-VEGF therapy of exudative AMD: Prognostic factors for therapy success. *Ophthalmologie* 2011;108(2):124-131
- 18 Das A, Fishero BA, Christophel JJ, *et al.* Poly(lactic-co-glycolide) polymer constructs cross-linked with human BMP-6 and VEGF protein significantly enhance rat mandible defect repair. *Cell Tissue Res* 2016;364(1):125-135
- 19 Arjunan P, Gnanaprakasam JP, Ananth S, *et al.* Increased Retinal Expression of the Pro-Angiogenic Receptor GPR91 via BMP6 in a Mouse Model of Juvenile Hemochromatosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(4):1612-1619