

文章编号:1000-5404(2013)10-0985-03

论著

增殖性糖尿病视网膜病变患者玻璃体腺苷浓度和增殖膜中 CD73 表达的研究

郎敏¹,袁容娣²,陈春林¹,霍妍¹,邹欢¹,叶剑¹ (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科¹; 400037 重庆,第三军医大学新桥医院眼科²)

[摘要] **目的** 通过检测增殖性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者玻璃体腺苷浓度及增殖膜 CD73 的表达,探讨增殖性糖尿病视网膜病变与玻璃体腺苷浓度及增殖膜 CD73 表达之间的关系。**方法** 收集在本院眼科行玻璃体切除手术的患者共 30 例,分为 PDR 组(共 16 例 16 眼)和对照组(孔源性视网膜脱离、黄斑前膜、特发性黄斑裂孔共 14 例 14 眼)。于患者玻璃体切除手术中收集玻璃体、视网膜增殖膜及黄斑前膜。应用高效液相紫外检测器检测患者玻璃体腺苷浓度,Western blot 检测膜样本中 CD73 的表达。**结果** PDR 组玻璃体腺苷浓度及增殖膜 CD73 表达均高于对照组 [(62.37 ± 11.47) μmol/L vs (30.34 ± 6.41) μmol/L, $P = 0.000$; (0.84 ± 0.08) vs (0.39 ± 0.05), $P = 0.002$]; PDR 组患者的年龄、糖尿病病程、术前空腹血糖均与玻璃体腺苷浓度无相关关系 ($r = 0.255, P = 0.340$; $r = 0.318, P = 0.230$; $r = 0.341, P = 0.197$)。**结论** 腺苷和 CD73 在 PDR 患者的玻璃体及增殖膜中的表达较非视网膜新生血管性疾病患者明显升高,提示二者可能参与了增殖性糖尿病视网膜病变新生血管的形成。

[关键词] 腺苷;CD73;增殖性糖尿病视网膜病变;视网膜新生血管

[中图分类号] R363.21;R587.2;R774.1

[文献标志码] A

Vitreous level of adenosine and proliferative membrane expression of CD73 in patients with proliferative diabetic retinopathy

Lang Min¹, Yuan Rongdi², Chen Chunlin¹, Huo Yan¹, Zou Huan¹, Ye Jian¹ (¹Department of Ophthalmology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; ²Department of Ophthalmology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the level of adenosine in vitreum and the expression of CD73 in proliferative membrane in patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR). **Methods** Thirty patients underwent vitrectomy in the Ophthalmology at Daping Hospital were divided into two groups, including a PDR group ($n = 16$) and a control group ($n = 14$). Rhegmatogenous retinal detachment, idiopathic macular hole and macular epiretinal membrane were included in the control group. The level of adenosine in vitreum was measured by HPLC, and the expression of CD73 in preretinal membranes was measured by Western blotting. **Results** The level of adenosine in the PDR group was significantly higher than that in the control group [(62.37 ± 11.47) μmol/L vs (30.34 ± 6.41) μmol/L, $P = 0.000$]. The expression of CD73 in the PDR group was significantly higher than that in the control group (0.84 ± 0.08 vs 0.39 ± 0.05, $P = 0.002$). There was no correlation with age, course of diabetes and fasting plasma glucose in the PDR patients and the concentration of adenosine in vitreum before operation ($r = 0.255, P = 0.340$; $r = 0.318, P = 0.230$; $r = 0.341, P = 0.197$). **Conclusion** Adenosine and CD73 may be involved in the progress of neovascularization in PDR.

[Key words] adenosine; CD73; proliferative diabetic retinopathy; retinal neovascularization

Supported by the Youth Creative Talents Foundation of Third Military Medical University (2010XQN37). Corresponding author: Ye Jian, E-mail: yejian1979@163.com

视网膜新生血管性疾病如糖尿病性视网膜病变

(proliferative diabetic retinopathy, PDR)、早产儿视网膜病变、视网膜静脉阻塞等造成的渗出、出血等病理改变可导致严重的视力损害,甚至失明。腺苷是组织缺血、缺氧中关键的介质,广泛存在于细胞内液和细胞外液中,可由 CD73(胞外-5'-核苷酸酶)催化细胞外间质中

[基金项目] 第三军医大学青年创新人才基金(2010XQN37)

[通信作者] 叶剑, E-mail: yejian1979@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1105.019.html> (2013-03-21)

的 AMP 水解生成。已有研究^[1-4]表明腺苷在皮肤、心脏、骨骼肌及肿瘤等组织以及氧诱导的视网膜病变的动物模型中有促进血管新生的作用,但是腺苷是否参与了人视网膜新生血管的发生、发展目前尚不清楚。为此,本研究检测了增殖性糖尿病视网膜病变患者玻璃体腺苷浓度及增殖膜 CD73 的表达情况,从而为下一步深入研究腺苷在视网膜新生血管性疾病中的作用及其机制奠定基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2012年9-11月在我科住院治疗且符合本研究纳入排除标准的患者共30例,分为PDR组和对照组。PDR组:16例16眼,其中男性9例,女性7例;年龄26~67(52.44±13.43)岁;1型糖尿病2例,2型糖尿病14例,糖尿病病程1~20(8.06±5.27)年;术前空腹血糖3.20~10.52(5.19±1.91)mmol/L;参照我国1984年眼底病学术会议制订的分期标准^[5]及玻璃体切除术中眼底所见,最后诊断IV期6例,V期4例,VI期6例。对照组:14例14眼,其中男性8例,女性6例,年龄20~64(51.64±11.05)岁,所患疾病分别为:孔源性视网膜脱离9例,特发性黄斑裂孔1例,黄斑前膜4例;所有患者均无糖尿病病史,无视网膜新生血管性疾病,术前空腹血糖均在正常值范围内(3.67~6.10 mmol/L)。

1.2 入选和排除标准

入选标准:①年龄≥18岁,性别不限;②诊断为PDR患者;③诊断为孔源性视网膜脱离、特发性黄斑裂孔黄斑前膜患者,排除糖尿病及视网膜新生血管性疾病;④术眼首次行玻璃体切除手术。排除标准:①年龄<18岁;②有眼部其他疾病,如青光眼、角膜新生血管、脉络膜脱离、视网膜静脉周围炎等;③近3年内有术眼外伤史;④近半年内有术眼部手术史;⑤有其他诊断明确的全身系统性疾病(如冠心病、代谢性疾病等);⑥PDR患者玻璃体出血的时间<3个月。患者术前行眼底荧光造影(FFA)检查明确是否有视网膜新生血管,部分PDR患者因玻璃体混浊眼底看不清,则在术中判断,可见视网膜新生血管呈芽状或迂曲网眼状,其周围常伴有纤维增殖膜。所有纳入研究的患者均签署了本研究的知情同意书。

1.3 标本采集

采用标准的经睫状体平部三切口玻璃体切除术,手术开始时关闭灌注管,将5 mL 无菌注射器连接于玻切头,直视下切除玻璃体,获得200 μL 术眼未稀释的玻璃体液,随后打开灌注继续手术。在冰上立即将抽出的玻璃体样本注入无菌EP管(预填充300 μL 腺苷抑制剂混合液)并摇匀。切除玻璃体后,使用剥膜钩将膜样本挑起,并用剥膜镊平行于视网膜切线方向小心撕除,收集剥除的PDR增殖膜、黄斑前膜、单纯网脱增殖膜。将所有玻璃体及膜样本分为PDR组和对照组,立即置于-80℃低温冰箱冻存。

1.4 高效液相紫外检测器检测患者玻璃体腺苷浓度

由于腺苷半衰期仅1 s至数秒,所以样本取出后立即加入预混的腺苷抑制剂,然后参照文献^[6]的方法处理及检测。抑

制剂混合液的配置:10 μmol/L 已酮可可碱(5'-核苷酸酶抑制剂;Sigma-Aldrich)、100 μmol/L 双嘧达莫(腺苷重摄取抑制剂;Sigma-Aldrich)、1 μmol/L Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine hydrochloride (EHNA, 腺苷脱氨酶抑制剂;Sigma-Aldrich)。

标本处理:取出已混有抑制剂的玻璃体样本500 μL 置冰上,加入1 nmol/L 高氯酸40 μL,超声匀浆后于12 000 r/min 4℃离心5 min,提取上清液,用1 mmol/L KOH调pH为7,过滤(0.2 μm)。

HPLC检测,仪器:Agilent 1200 series HPLC;色谱柱:300EX-C18(250 mm×4.6 mm);进样量:20 μL;流速:1.0 mL/min;流动相:A 10 mmol/L KH₂PO₄(pH=4.0),B:甲醇(1%~10%,30 min);温度:25℃;灵敏度0.005 AUFs;紫外检测器:检测波长254 nm。

1.5 Western blot 检测增殖膜中 CD73 蛋白的表达

取出PDR组和对照组增殖膜样本,RIPA裂解液(碧云天公司,江苏)提取总蛋白,BCA法测定蛋白含量,上样量为50 μg。蛋白进行10% SDS-PAGE凝胶电泳,PVDF膜转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h;加入一抗:anti-CD73(1:1 000,Abcam公司,Cambridge,UK),anti-GAPDH(1:1 000,北京中杉金桥公司),4℃过夜,二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠(1:1 000,北京中杉金桥公司)。ECLipse发光试剂3~5 min曝光、显影、定影。数码成像分析系统进行结果分析。用GAPDH作为内参照,CD73与GAPDH条带的光密度比值作为CD73蛋白的表达值。

1.6 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组之间比较采用t检验,PDR组内患者年龄、糖尿病病程、空腹血糖与玻璃体腺苷浓度之间的关系采用两个变量间的Pearson相关分析。

2 结果

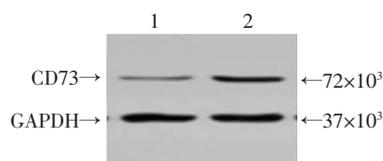
2.1 玻璃体腺苷浓度

患者玻璃体腺苷浓度在PDR组为(63.50±11.60)μmol/L,对照组为(30.34±6.41)μmol/L,2组患者玻璃体腺苷浓度差异有显著性(P=0.000)。

PDR组患者年龄与玻璃体腺苷浓度无相关关系(r=0.255,P=0.340);糖尿病病程与玻璃体腺苷浓度无相关关系(r=0.318,P=0.230);术前空腹血糖与玻璃体腺苷浓度无相关关系(r=0.341,P=0.197)。

2.2 2组患者增殖膜中 CD73 蛋白的表达

Western blot检测显示2组患者膜样本中均有CD73蛋白的表达,CD73蛋白在PDR组(0.84±0.08)表达量明显高于对照组(0.39±0.05),组间差异有统计学意义(P=0.002,图1)。



1:对照组;2:PDR组

图1 Western blot 检测 CD73 蛋白在 2 组膜样本中的表达

3 讨论

增殖性糖尿病视网膜病变是临床常见的新生血管性眼病,可导致严重的视功能损害,甚至失明。由于视网膜毛细血管闭塞缺血、缺氧而形成的新生血管是增殖期糖尿病视网膜病变的主要病理特征,因此如何有效抑制视网膜新生血管形成是挽救 PDR 患者视力的关键。

腺苷作为一种生物体内源性核苷酸,广泛存在于细胞内液和细胞外液中。胞外腺苷浓度在生理状态下约为 1~50 nmol/L,而在局部组织缺血、应激等状态下急剧上升至 1 000 nmol/L^[7]。Lutty 等^[8]建立氧诱导的视网膜病变(Oxygen-induced retinopathy, OIR)的动物模型,结果显示视网膜中腺苷的表达在血管闭塞期减少,在血管增生期显著提高。然而,腺苷在增殖性糖尿病视网膜病变患者玻璃体中的水平以及是否参与了视网膜新生血管的形成尚不清楚。本研究发现 PDR 组患者玻璃体中腺苷浓度高于非视网膜新生血管性疾病患者($P=0.000$),提示增殖性糖尿病视网膜病变与玻璃体高浓度腺苷密切相关。这一研究进一步证实了腺苷可能参与增殖性糖尿病视网膜病变视网膜新生血管的形成。

腺苷是腺嘌呤核苷酸代谢的中间产物,尽管缺氧状态下胞外腺苷的来源尚存在争论,但通过三磷酸代谢途径产生仍被认为是腺苷的主要来源^[9],即 ATP 通过胞外的三磷酸腺苷酶迅速水解为二磷酸腺苷、一磷酸腺苷(Adenosine Monophosphate, AMP)。AMP 通过 2 种途径水解成为腺苷:①在胞外 5'-核苷酸酶(ecto-5'-nucleotidase, CD73)作用下去磷酸化变成腺苷;②通过脱氨酶转变成次黄嘌呤核苷酸(inosine monophosphate, IMP)。其中第 1 条为主要途径,也就是说 CD73 是生成胞外腺苷的关键酶。本研究 Western blot 结果显示增殖性糖尿病视网膜病变组增殖膜样本中 CD73 的表达高于对照组($P=0.002$),提示 CD73 可能与增殖性糖尿病视网膜病变新生血管的形成有相关性。王丽^[10]研究表明 CD73 野生型小鼠乳腺癌新生血管明显多于 CD73 基因敲除小鼠,并且抑制 CD73 的活性可降低裸鼠乳腺癌血管新生,提示 CD73 在肿瘤血管新生中可能发挥重要作用。Yegutkin 等^[11]认为 CD73 可以促进黑色素瘤血管的形成。而 CD73 在血管发生中的作用机制,可能是 CD73 水解 AMP 生成腺苷,促进视网膜血管内皮细胞的增殖、运动和管腔的形成,最后在血管发生中发挥重要作用^[12]。

在 OIR 模型中,腺苷和 CD73 的表达在高氧血管闭塞期低于对照组,而在视网膜缺氧导致病理性血管

生成时,二者均表达上调^[13]。也就是说,CD73 与腺苷一样,在视网膜缺氧且有新生血管形成时期均显著增加。而 CD73 是胞外腺苷产生的关键酶,因此我们推测,如应用 CD73 特异性的抑制剂(α , β -methylene ADP, APCP)抑制 CD73 的活性,则有可能减少胞外腺苷的生成,达到抑制视网膜新生血管生成的目的,这可为视网膜新生血管性疾病提供新的治疗策略和药物靶点。

参考文献:

- [1] Montesinos M C, Shaw J P, Yee H, *et al.* Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(6): 1887 - 1892.
- [2] Ryzhov S, Solenkova N V, Goldstein A E, *et al.* Adenosine receptor-mediated adhesion of endothelial progenitors to cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2008, 102(3): 356 - 363.
- [3] Ryzhov S, McCaleb J L, Goldstein A E, *et al.* Role of adenosine receptors in the regulation of angiogenic factors and neovascularization in hypoxia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320(2): 565 - 572.
- [4] Merighi S, Benini A, Mirandola P, *et al.* Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(2): 395 - 406.
- [5] 中华医学会眼科学分会眼底病学组, 糖尿病视网膜病变分期标准 [J]. *眼底病杂志*, 1985, 1(1): 42.
- [6] Fenton R A, Dobson J G, Jr. Reduced adenosine release from the aged mammalian heart [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(11): 3709 - 3714.
- [7] Rivkees S A, Zhao Z, Porter G, *et al.* Influences of adenosine on the fetus and newborn [J]. *Mol Genet Metab*, 2001, 74(1/2): 160 - 171.
- [8] Lutty G A, Merges C, McLeod D S. 5' nucleotidase and adenosine during retinal vasculogenesis and oxygen-induced retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(1): 218 - 229.
- [9] Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41: 775 - 787.
- [10] 王丽. CD73 在肿瘤血管新生中的作用 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [11] Yegutkin G G, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, *et al.* Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5): 1231 - 1241.
- [12] Sadej R, Spsychala J, Skladanowski A C. Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2006, 25(9/11): 1119 - 1123.
- [13] Li X, Zhou T, Zhi X, *et al.* Effect of hypoxia/reoxygenation on CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in mouse microvessel endothelial cell lines [J]. *Microvasc Res*, 2006, 72(1/2): 48 - 53.

(收稿:2013-01-11;修回:2013-03-02)

(编辑 张 维)