

糖尿病视网膜病变患者外周血中性粒细胞表面 CD18 的表达

宋虎平 田冰玉 朱忠桥 杨新光 惠延年

Expression of CD18 on the neutrophils of patients with diabetic retinopathy

Song Huping, Tian Bingyu, Zhu Zhongqiao, Yang Xinguang, Hui Yannian. Department of Ophthalmology, Xi'an NO. 4 Hospital, Xi'an 710004, China

Abstract Objective Diabetic retinopathy (DR) is a severe complication of diabetes. Experimental study demonstrated that CD18 plays an important role in the development of DR. But the relationship between DR severity and CD18 expression is unclear. This study was to investigate the expression of CD18 on the neutrophils in patients with various stages of DR and determine the relationship between CD18 and development of DR. **Methods** Level of CD18 on neutrophils was measured by flow cytometry in 10 patients with the DR of stage 1, 14 patients with DR of stages 2-4, 14 patients with DR of stage 5 and 10 non-diabetic healthy subjects (control). **Results** No significant differences were found in the age and gender among the subjects of 4 groups ($P > 0.05$). Mean channel fluorescence (MCF) of CD18 on neutrophils from the control, stage 1, stages 2-4 and stage 5 of DR patients was 1.36 ± 0.17 , 2.99 ± 1.44 , 3.13 ± 1.10 and 4.11 ± 1.62 respectively, with the highest MCF level in the stage 5 of DR group and the least MCF level in the control group, showing a significant difference among them ($P < 0.01$). This trend remained even after adjusting for confounding variables. The statistical analysis indicated that this trend was only significant in type 2 diabetic patients. Multiple linear regression against the level of CD18 MCF by stage of DR and covariates revealed a significant and independent correlation with the stage of DR ($\beta = 0.33$, $P = 0.01$). **Conclusion** CD18 is overexpressed on neutrophils in each stage of DR in type 2 diabetic patients. The expression level of CD18 is positive associated with stage of DR. CD18 may be a marker of the development of DR in type 2 diabetes.

Key words diabetic retinopathy; CD18; neutrophil

摘要 目的 研究不同程度糖尿病视网膜病变(DR)患者外周血中性粒细胞表面 CD18 的表达。**方法** 38 例 DR 患者,其中包括 1 期 DR 组 10 例,2~4 期 DR 组 14 例,5 期 DR 组 14 例。正常对照组 10 例。流式细胞仪测量受试者外周血中性粒细胞表面 CD18 的表达。**结果** 4 个组 CD18 平均荧光强度(MCF)之间的差异有统计学意义($P < 0.01$)。CD18 的表达水平最高为 5 期 DR 组,其次为 2~4 期 DR 组及 1 期 DR 组,最低为正常对照组(趋势检验, $P < 0.01$)。调整混杂因素后这种趋势仍然存在。多元线性回归分析显示 CD18 的 MCF 水平与 DR 分期存在显著相关性($\beta = 0.33$, $P = 0.01$)。**结论** 外周血中性粒细胞表面 CD18 水平的提高可能是 2 型糖尿病患者 DR 进展的临床标志。

关键词 糖尿病视网膜病变; CD18; 中性粒细胞

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)01-0063-04

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的严重并发症之一。关于 DR 的确切机制目前尚不清楚。动物实验显示,视网膜血管中白细胞聚集是造成 DR 的早期关键事件^[1-2], CD18 在这个事件中起着

着重要的作用^[3]。在人类同样发现 CD18 在 DR 的发展中起着重要的作用^[4]。但是关于 CD18 表达水平和 DR 临床分期之间的关系尚未见报道。本文研究来自不同阶段 DR 患者中性粒细胞表面 CD18 的表达水平,探讨将其作为 DR 发展阶段临床标志的可能性。

1 资料与方法

1.1 资料

本课题为陕西省科技发展计划项目基金资助(2007K 01-37)

作者单位:710004 西安市第四医院眼科(宋虎平、田冰玉、朱忠桥、杨新光);710032 西安市第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所(惠延年)

通讯作者:宋虎平(Email:songhpxian@163.com)

1.1.1 一般资料 2005年3月~9月在西安市第四医院眼科门诊就诊的DR患者38例,其中1期10例,男6例,女4例;2~4期14例,男6例,女8例;5期14例,男8例,女6例。10例年龄匹配的非糖尿病健康人作为正常对照组。计算体重指数(BMI, kg/m²)和腰围-臀围比例(WHR)。所有观察对象都以标准的水银柱血压计测量坐位右手臂血压。眼底由同一眼科医师检查并分级。分级参照DR和糖尿病黄斑水肿的国际临床分类标准^[5]。排除有心绞痛、心肌梗死、中风、糖尿病神经病变、糖尿病肾病等大血管并发症病史及白细胞计数在 $4 \times 10^9/L \sim 10 \times 10^9/L$ 范围外的患者。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物制品公司); RPMI 1640(美国Hyclone公司); 肝素钠注射液(上海第一生化药业公司第一制药厂); Histopaque, Lymphoprep(美国Sigma公司); PE-鼠抗人IgG(美国Chemicon公司); PE-鼠抗人CD18(美国Chemicon公司); FACScan流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)。

1.2 方法

1.2.1 中性粒细胞的分离 取受试者静脉血5 mL于含有100 U/mL肝素的注射器内,放置于无菌离心管中,200 g离心20 min,去除上层富含血小板的血浆,用不含Ca²⁺/Mg²⁺的Hanks平衡盐加至原体积。混匀后,缓慢加到含有等体积1.119 g/mL Histopaque和1.077 g/mL Lymphoprep双层液的离心管中,450 g离心16 min,吸出中性粒细胞层,再用不含Ca²⁺/Mg²⁺的Hanks平衡盐洗2次^[6]。离心沉淀为分离的中性粒细胞。

1.2.2 流式细胞仪检查 通过流式细胞仪检查外周血中性粒细胞表面CD18的表达量,采用直接荧光技术,参照Fusman等^[7]的方法进行。取 1×10^5 个细胞,溶于1.5 mL RPMI 1640培养液中,加入5%胎牛血清,置于冰上孵育10 min,4℃,300 g离心5 min,弃上清,以含有0.5 μL的0.5 mg/mL鼠抗人IgG抗体的RPMI-5% FBS重悬细胞,冰上孵育5 min,加400 μL的20 mg/mL藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的鼠抗人CD18抗体,冰上孵育30 min。以FACScan统计 1×10^4 细胞的荧光强度。检查结果统计为中性粒细胞表面平均荧光强度(mean channel fluorescence, MCF)以及CD18阳性细胞的比例。

1.3 统计学方法

采用SPSS 11.0统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。DR分级和糖尿病的类型以哑变量统计。计量资料组间比较采用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA),计数资料的组

间比较采用 χ^2 检验。以广义线性模型计算不同DR的CD18 MCF水平。在每个小组内,采用以下3种模型计算CD18 MCF:原始的模型、调整了有组间显著性差异变量的模型以及调整了其他没有组间差异的变量的模型。采用协方差分析(analysis of covariance, ANCOVA)判定不同DR分组之间的CD18 MCF是否有差异,并且对不同DR分组之间CD18 MCF的变化做趋势分析。以CD18 MCF为因变量,采用简单线性回归分析判断CD18 MCF和DR分期以及其他变量之间的关系,同时用多元线性回归分析判定CD18 MCF和DR分期之间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者的临床和生化指标

4个组间年龄、性别分布差异均无统计学意义($P = 0.07, 0.83$)。4个组FPG、SBP、DBP、HbA1c、TG、VLDLc及WBC计数间差异均有统计学意义($P < 0.05$),其他变量之间差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

表1 DR各组和正常对照组患者临床及生化指标
Table 1 Clinical and biochemical characteristics of DR group and the control group

Variable	Control group	DR stage 1	DR stage 2-4	DR stage 5	F	P
N(M/F)	10(5/5)	10(6/4)	14(6/8)	14(8/6)	0.89*	0.83
Age(years)	48.48 ± 6.94	47.70 ± 2.79	49.92 ± 2.36	51.64 ± 2.23	2.48	0.07
BMI(kg/m ²)	20.76 ± 1.57	21.70 ± 1.82	22.13 ± 1.45	22.21 ± 1.36	2.09	0.15
WHR	0.85 ± 0.14	0.89 ± 0.09	0.91 ± 0.18	0.92 ± 0.16	1.45	0.24
FPG(mmol/L)	4.54 ± 0.46	8.65 ± 1.33	8.51 ± 1.54	9.05 ± 1.76	72.42	<0.01
SBP(mmHg)	103.10 ± 13.75	124.80 ± 15.48	127.92 ± 8.92	133.42 ± 10.31	13.61	<0.01
DBP(mmHg)	67.70 ± 5.55	80.70 ± 4.66	79.57 ± 3.13	82.50 ± 2.95	29.74	<0.01
HbA1c%	5.66 ± 0.27	8.91 ± 1.28	8.63 ± 0.76	8.46 ± 1.23	21.23	<0.01
Cholesterol(mg/dL)	163.10 ± 16.67	186.60 ± 32.66	192.42 ± 20.17	196.35 ± 21.40	4.64	0.07
HDLc(mg/dL)	45.54 ± 5.37	43.90 ± 8.07	44.72 ± 5.10	42.91 ± 10.75	0.31	0.82
LDLc(mg/dL)	97.05 ± 15.88	101.80 ± 23.60	96.92 ± 18.30	105.35 ± 16.56	0.59	0.62
TG(mg/dL)	125.80 ± 21.60	218.90 ± 64.83	246.07 ± 75.06	234.00 ± 50.79	9.64	<0.01
VLDLc(mg/dL)	19.90 ± 11.25	41.68 ± 18.04	39.64 ± 10.12	42.91 ± 10.75	10.63	<0.01
Total WBC count	6 712 ± 963	8 181 ± 913	8 363 ± 681	8 089 ± 1 070	13.59	<0.01

*: χ^2 value

DR: diabetic retinopathy; BMI: body mass index; WHR: waist-to-hip ratio; FPG: fasting plasma glucose; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HbA1c: glycosylated hemoglobin; WBC: white blood cell; HDLc: high-density lipoprotein; LDLc: low-density lipoprotein cholesterol; VLDLc: very-low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides

2.2 流式细胞仪检查

不同DR分组之间CD18 MCF如表2所示。DR程度越重,CD18 MCF则越高,各组之间CD18 MCF差异有统计学意义。调整了其他变量的影响之后,CD18 MCF和DR之间仍有显著相关性。趋势检验差异也有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

表 2 多变量调整后各期 DR 患者中性粒细胞表面 CD18 MCF 值($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Multivariate adjusted mean CD18 MCF according to stage of DR($\bar{x} \pm s$)

Group	Crude*	First adjusted#	Second adjusted#
Normal	1.36 ± 0.17	1.43 ± 0.25	1.59 ± 0.29
DR stage 1	2.99 ± 1.44	2.51 ± 0.22	2.06 ± 0.26
DR stage 2-4	3.13 ± 1.10	3.36 ± 0.30	3.10 ± 0.22
DR stage 5	4.11 ± 1.62	4.30 ± 0.64	4.26 ± 0.23
P	0.00	0.00	0.00
Trend P value	0.00	0.02	0.04

*: $\bar{x} \pm SD$, #: $\bar{x} \pm SE$

Test of trend was performed using mean of each group as its representative value

First adjusted variables including WHR, fasting plasma glucose, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, HbA1c%, TG, VLDLc and Total WBC count; Second adjusted variables including age, BMI, cholesterol, HDLc and LDLc

简单线性回归分析显示 CD18 MCF 和 DR 分期呈显著正相关($\beta = 0.73, P = 0.00$), 多元线性回归分析之后两者之间仍然存在显著相关关系($\beta = 0.33, P = 0.01$)。除 DR 以外, 和 CD18 MCF 有简单相关关系的变量有 BMI、FPG、SBP、DBP、HbA1c、胆固醇、LDL、VLDL、TG、WBC 计数。经多元回归分析之后, 只有 DR、FPG、SBP 和 HDLc 与 CD18 MCF 呈显著相关性(表 3)。

表 3 以 CD18 MCF 为因变量的多元回归分析参数估计

Table 3 Parameter estimates in multiple regression analysis with CD18 MCF as the dependent variable

Independent variable	Univariate		Multivariate	
	β	P	β	P
DR stage	0.73	<0.01	0.33	0.01
Age	0.26	0.33	0.03	0.75
BMI	0.50	<0.01	0.01	0.92
WHR	0.22	0.06	-0.04	0.66
FPG	0.80	<0.01	0.41	0.03
SBP	0.68	<0.01	0.28	0.02
DBP	0.63	<0.01	-0.04	0.77
HbA1c%	0.57	<0.01	0.01	0.97
Cholesterol	0.44	0.01	0.04	0.70
HDLc	0.27	0.02	0.23	0.01
LDLc	0.28	0.02	0.15	0.15
TG	0.51	<0.01	-0.05	0.66
VLDLc	0.47	<0.01	0.02	0.86
Total WBC count	0.44	0.01	-0.08	0.51

DR: diabetic retinopathy; BMI: body mass index; WHR: waist-to-hip ratio; FPG: fasting plasma glucose; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HbA1c: glycosylated hemoglobin; WBC: white blood cell; HDLc: high-density lipoprotein; LDLc: lowdensity lipoprotein cholesterol; VLDLc: very-low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides

考虑到糖尿病类型对 CD18 水平的可能影响, 我们将糖尿病患者根据糖尿病类型分为两组, 患者的资料如表 4 所示。2 型糖尿病患者年龄和 BMI 都大于 1 型患者。经多元线性回归分析结果示, CD18 MCF 和 DR 之间无显著相关性($\beta = -0.35, P = 0.06$)。

表 4 1 型和 2 型糖尿病患者临床和生化指标

Table 4 Clinical and biochemical characteristics of type 1 and type 2 diabetic groups

Variables	Type 1 diabetes	Type 2 diabetes
n	9	29
Sex (M/F)	5/4	15/14
Ages (years)	46.88 ± 2.14	50.93 ± 2.31
BMI (kg/m ²)	22.55 ± 0.23	23.89 ± 1.56
WHR	0.90 ± 0.09	0.92 ± 0.07
FBG (mmol/L)	8.88 ± 1.26	8.70 ± 0.76
SBP (mmHg)	124.88 ± 14.59	130.44 ± 10.57
DBP (mmHg)	83.88 ± 3.82	81.58 ± 3.43
HbA1c%	8.00 ± 1.30	8.52 ± 1.02
Cholesterol (mg/dl)	197.88 ± 31.92	190.62 ± 21.28
HDLc (mg/dl)	44.00 ± 6.16	45.34 ± 6.16
LDLc (mg/dl)	105.88 ± 24.30	99.89 ± 18.30
Triglycerides (mg/dl)	219.66 ± 81.20	239.06 ± 57.81
VLDLc (mg/dl)	39.31 ± 16.27	44.44 ± 11.21
Total WBC count	8 263 ± 814	8 510 ± 751
CD18 MCF	3.46 ± 1.65	3.61 ± 1.01

BMI: body mass index; WHR: waist-to-hip ratio; FPG: fasting plasma glucose; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HbA1c: glycosylated hemoglobin; WBC: white blood cell; HDLc: high-density lipoprotein; LDLc: lowdensity lipoprotein cholesterol; VLDLc: very-low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides

3 讨论

本研究结果显示 CD18 MCF 和 DR 的程度存在相关性。DR 越重, CD18 MCF 水平越高, 在调整了其他变量的影响后, 经 ANCOVA 分析仍然存在这种相关性。他们之间的简单相关系数为 $\beta = 0.73 (P = 0.00)$, 多元回归系数为 $\beta = 0.33 (P = 0.01)$ 。CD18 MCF 和糖尿病分型之间无相关性。

DR 是目前糖尿病患者的重要致盲原因, 发病机制仍不明确^[8]。动物实验显示白细胞和血管内皮细胞之间的黏附是 DR 早期的关键事件, 这些白细胞主要是中性粒细胞和单核细胞^[1-2]。白细胞和血管内皮细胞之间的黏附与糖尿病动物粒细胞表面 CD18 的高表达以及由 CD18 介导的黏附相关^[3]。Barouch 等^[3]发现早期糖尿病大鼠中性粒细胞表面 CD18 表达升高。同时视网膜白细胞浸润增加, 中性粒细胞与体外培养的血管内皮细胞黏附增多。同样, 在实验性糖尿病大鼠体内使用抗 CD18 抗体明显降低了视网膜白细

胞聚集的数量。在长期糖尿病大鼠体内也发现同样的现象^[9]。选择性敲除小鼠 CD18 和 ICAM-1 基因后发现,CD18^{-/-}和 ICAM-1^{-/-}小鼠在糖尿病诱导成功后 11 个月和 15 个月视网膜白细胞黏附数量明显少于野生型动物,同时血管内皮细胞损伤和血管渗漏较野生型对照组明显较轻。

在人类同样发现 CD18 在 DR 的发展中起着重要的作用。Rao 等^[4]报道在加热条件下,来自 DR 患者的中性粒细胞 CD18 水平明显高于非糖尿病组。但是关于 CD18 表达水平和 DR 临床分期之间的关系尚未见报道。有资料显示在糖尿病状态下,人类白细胞表达 CD18 也有改变^[7]。Rao 等^[4]检查了 DR 患者及健康对照者外周血中性粒细胞表面 CD11b、CD18 和 CD62L 的表达,发现在 4℃ 条件下,DR 患者与对照组之间 CD18 水平差异无统计学意义;加热到 37℃ 后,DR 患者中性粒细胞表面 CD18 水平显著高于健康对照组。Grykiel 等^[10]研究结果显示 I 型糖尿病患者中性粒细胞表面 CD11b 和 CD18 表达增高,说明这些细胞在糖尿病状态下活性提高。本文结果与上述文献报道近似,但这些文献没有报道 CD18 水平和 DR 分期之间的相关性。本研究发现,糖尿病患者外周血中性粒细胞表面 CD18 水平随着 DR 的进展而提高。

中性粒细胞表面 CD18 水平和 DR 之间的相关性提示与 DR 进展有关的全身因素导致 CD18 水平的提高。高糖血症被认为是糖尿病微血管并发症的重要因素^[11]。研究显示高糖培养基和高糖血症患者血浆培养之后,白细胞和内皮细胞的黏附增强^[12-13]。Shanmugam 等^[14]发现高糖培养可以提高单核细胞 β₂-整合素基因和蛋白表达水平。本研究也发现,无论是简单相关分析还是多元回归分析,均显示 CD18 与 FPG 呈正相关,与文献报道一致。Delamaire 等^[15]曾报道糖尿病的类型和 CD18 水平相关,本研究中未发现类似的结果。我们认为一些和两型糖尿病均有关的共同的因素上调了中性粒细胞表面 CD18 的表达,如高糖血症。

总之,本研究结果显示 DR 患者中性粒细胞表面 CD18 表达的改变和 DR 的进展一致,CD18 可能在 DR

的进展中起着重要的作用。中性粒细胞表面 CD18 水平的提高可能是 II 型糖尿病患者 DR 进展的临床标志。

参考文献

- 1 Jousseaume AM, Murata T, Tsujikawa A, et al. Leukocyte mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina[J]. Am J Pathol, 2001,158: 147 - 152
- 2 Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10836 - 10841
- 3 Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, et al. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 1153 - 1158
- 4 Rao KM, Hatchell DL, Cohen HJ, et al. Alterations in stimulus-induced integrin expression in blood neutrophils of patients with DRP [J]. Am J Med Sci, 1997, 313: 131 - 137
- 5 Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, et al. Global DRP Project Group proposed international clinical DRP and diabetic macular edema disease severity scales [J]. Ophthalmology, 2003, 110: 1677 - 1682
- 6 Hirayama A, Noronha-Dutra AA, Gordge MP, et al. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidino compounds [J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11: 684 - 689
- 7 Fusman R, Rotstein R, Zeltser D, et al. The state of leukocyte adhesiveness/aggregation in the peripheral blood of patients with type 2 diabetes and ischemic vascular disease [J]. Acta Diabetol, 2001, 38: 43 - 49
- 8 Merimee TJ. Diabetic retinopathy; a synthesis of perspectives [J]. N Engl J Med, 1990, 322: 978 - 988
- 9 Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? [J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86: 363 - 365
- 10 Grykiel K, Zozulinska D, Kostorzewa A, et al. Evaluation of expression of polymorphonuclear neutrophil surface receptors in patients with type 1 diabetes [J]. Pol Arch Med Wewn, 2001, 105: 377 - 381
- 11 Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M. Glucose and diabetic vascular disease [J]. FASEB J, 1992, 6(11): 2905 - 2914
- 12 Park CW, Kim JH, Lee JH, et al. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kappa B-dependent [J]. Diabetologia, 2001, 43: 1544 - 1553
- 13 Morigi M, Angioletti S, Imberti B, et al. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-κB-dependent fashion [J]. J Clin Invest, 1998, 101: 1905 - 1915
- 14 Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, et al. High glucose induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells [J]. Diabetes, 2003, 52: 1256 - 1264
- 15 Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, et al. Impaired leukocyte functions in diabetic patients [J]. Diabet Med, 1997, 14: 29 - 34

(收稿:2008-04-20 修回:2008-10-10)

(本文编辑:胡纯钢 刘 艳)

本刊稿约声明

本刊已入编美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘》、俄罗斯《科学文摘》(AJ)、中国科学引文数据库(CSCD)、中国生物医学文献光盘数据库检索系统(CBMdisc)、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中国期刊全文数据库(CJFD)、中国学术期刊光盘版(CNKI)、维普科技期刊数据库(光盘)、万方数据网络系统、中文科技期刊数据库、台湾华艺中文电子期刊服务(CEPS)一思博网等电子数据库。其作者文章著作权使用费与本刊稿费一次性付清。凡不同意入编的稿件,请作者在投稿时声明。

(本刊编辑部)