

类胰岛素生长因子结合蛋白-6 作为 PVR 血清分子标志物的验证

于 靖 王 方

Determination of insulin-like growth factor binding protein 6 as a serum biomarker of PVR

Yu Jing, Wang Fang. Department of Ophthalmology, Affiliated Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Abstract Objective This study was to determine whether insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP-6) is a serum biomarker of the proliferative vitreoretinopathy (PVR). **Methods** The vitreous samples ($n=8$) were collected from the eyes with grade A, B, C, D of PVR respectively during intraoperation, and serum samples ($n=20$) were obtained preoperatively and 6 month postoperatively. The vitreous samples of donor eyes ($n=8$) and serum samples of normal population age- and gender-matched ($n=20$) were as normal controls. Western blotting analysis and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used for the detection of IGFBP-6 in vitreous and serum. The serum samples of encircling failure group ($n=8$) and silicone group ($n=8$) were analyzed by ELISA. Trial procedure followed the Statement of Helsinki. Written informed consent was obtained at initial of any clinical trial.

Results Western blotting analysis displayed that IGFBP-6 was detected in the vitreous and serum samples in 22 PVR patients out of 24 patients rather than the donor vitreous and normal serum samples. The band intensity of IGFBP-6 was higher in the samples from grade C and D of PVR than that of grade B. The concentration of IGFBP-6 in vitreous was significantly different among different grades of PVR groups ($F=3.34, P=0.04$). The ELISA outcomes documented that IGFBP-6 concentrations in vitreous and serum samples were significantly higher in severe PVR patients than those in moderate PVR. At 6 months after postoperation, IGFBP-6 level in serum of PVR was significantly lower than that of preoperation [$(65.4 \pm 31.8) \text{ pg/mL}$ vs $(185.3 \pm 34.9) \text{ pg/mL}$ ($t=11.10, P=0.015$)] and encircling failure group ($t=3.16, P=0.009$), but was similar to that of silicone group and normal group ($t=0.08, P=0.989$; $t=1.59, P=0.131$). **Conclusion** IGFBP-6 is a special protein in vitreous and serum of the PVR patients. The concentration of IGFBP-6 is correlated with the severity and prognosis of PVR. Therefore, IGFBP-6 can be the candicated serum biomarker of PVR.

Key words insulin-like growth factor binding protein 6; proliferative vitreoretinopathy; biomarker; proteome

摘要 目的 验证类胰岛素生长因子结合蛋白-6 (IGFBP-6) 是否可以作为增生性玻璃体视网膜病变 (PVR) 的血清分子标志物。 **方法** 收集 PVR A、B、C、D 级玻璃体 ($n=8$) 及术前术后 6 个月血清样本 ($n=20$), PVR C 级以上为严重 PVR。正常供体眼玻璃体样本 ($n=8$) 和健康体检者血清 ($n=20$) 作为正常对照, 对玻璃体和相应的血清样本分别进行 IGFBP-6 的免疫印迹分析和酶联免疫吸附试验 (ELISA)。环扎术后未愈者 ($n=8$) 和硅油眼 ($n=8$) 患者的血清样本进行 ELISA 分析。在临床研究中的个体使用方面符合赫尔辛基宣言, 参与试验者签署知情同意书。 **结果** 22 例 PVR 患者 (总体 24 例) 玻璃体和血清中可检测到 IGFBP-6, 而供体眼玻璃体和正常人的血清中未测到。PVR C 级、D 级中 IGFBP-6 条带明显强于 PVR B 级。ELISA 结果显示严重 PVR 患者玻璃体和血清中 IGFBP-6 质量浓度明显高于轻度 PVR ($F=3.34, P=0.04$)。PVR 患者术后 6 个月血清中 IGFBP-6 由 $(185.3 \pm 34.9) \text{ pg/mL}$ 明显下降至 $(65.4 \pm 31.8) \text{ pg/mL}$ ($t=11.10, P=0.015$), 与玻璃体术后硅油眼和正常对照组的血清中的质量浓度接近 ($t=0.08, P=0.989$; $t=1.59, P=0.131$), 但明显低于环扎术后未愈组 ($t=3.16, P=0.009$)。 **结论** IGFBP-6 是 PVR 患者玻璃体和血清的特异蛋白质, 与 PVR 的严重程度和预后评估相关, 可作为 PVR 血清分子标志物。

关键词 类胰岛素生长因子结合蛋白-6; 增生性玻璃体视网膜病变; 分子标志物; 蛋白质组

分类号 R 776.01 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)08-0641-04

本课题为国家自然科学基金 (30870558)、上海市启明星计划 (09QA1405100)、上海市卫生局基金 (2008179)、同济大学优秀青年人才培养计划 (2008KJ068) 资助

作者单位: 200072 上海, 同济大学附属第十人民医院眼科

通讯作者: 王方 (Email: milwangfang@yahoo.com.cn)

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是导致视网膜脱离手术失败最主要的原因之一^[1]。本研究使用二维液相色谱联合串联质谱 (two-dimensional-liquid chromatography coupled by tandem mass spectrometry, 2D-LC-MS/MS) 法对轻度和严重 PVR 的玻璃体蛋白质组进行分析, 发现类胰岛素生长因子结合蛋白-6 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBP-6) 是与增生有关的蛋白质之一^[2]。为了进一步验证其是否可以作为 PVR 的血清候选分子标志物, 分别采用免疫印迹分析和酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 进行定性和定量检测。

1 材料与方法

1.1 样本来源

PVR 患者玻璃体和血清样品均取自 2006 年 9 月—2007 年 1 月上海交通大学附属第一人民医院眼科收治的原发性裂孔源性视网膜脱离患者。样本来源满足以下条件: 3 年内无眼外伤史; 近半年内无眼部手术史; 无眼部其他疾病; 无糖尿病史及系统性疾病; 未同时进行白内障摘出手术。正常对照组 8 例, 主要为上睑下垂和年龄相关性白内障, 排除糖尿病和系统性疾病; 近 3 年内无眼外伤史; 无眼部炎症性疾病; 年龄与研究组相匹配。本临床研究的设计符合赫尔辛基宣言, 参与试验者均签署知情同意书。

收集 PVR 患者的玻璃体样本 PVR B、C、D 级各 8 例 (8 眼), 在进行标准平坦部三切口的玻璃体切割手术中未开启灌注液时获取。用 5 mL 注射器在玻璃体液化的中心部位抽取 0.3 ~ 1.0 mL 玻璃体液, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 将上层离心后的玻璃体液吸出, -80 ℃ 保存。正常玻璃体样本来自于供体眼 (上海市器官移植中心, 角膜移植手术取过角膜移植片后) 8 例。正常人血清来自同期健康体检者 20 例, 无糖尿病、系统性疾病及眼部疾病。同时收集 PVR A 级玻璃体样本用于 ELISA 定量分析。免疫印迹分析和 ELISA 检测各组的基线特征见表 1, 2。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 实验试剂 免疫印迹分析 IGFBP-6 抗体 (Abnova 公司); LI-COR IRDyeTM800-标记的二抗、驴抗人 IgG (Rockland 公司); PVDF 膜 (Pierce 公司); IGFBP-6 ELISA 试剂盒 NO: QRCT-332331233102213EIA\UTL (ADL 公司); ELISA 二抗: 兔抗鼠 IgG (Jackson 公司); 96 孔板 9018 (Costar 公司); DTT (Bio Basic 公司); 其他试剂为国产分析纯, 购自上海试剂公司。

表 1 免疫印迹分析的玻璃体和血清标本的一般资料

Table 1 The patient demographics of the vitreous and serum samples by Western blotting analysis

Group	N	Age(Y) *	Gender(M/F) #
PVR B	8	57.0 ± 6.5	2/6
PVR C	8	60.0 ± 6.3	4/4
PVR D	8	59.1 ± 10.0	8/0
Donor eyes	8	58.2 ± 8.3	6/2
Normal	20	56.2 ± 4.3	12/8

$F_{age} = 0.76, P = 0.525; \chi^2_{gender} = 10.59, P = 0.032$ (* : ANOVA, #: χ^2 test)

表 2 ELISA 分析的血清标本一般资料

Table 2 The patient demographics of the serum samples by ELISA

Group	N	Age(Y) *	Gender(M/F) #
PVR A	12	56.2 ± 8.9	7/5
PVR B	12	55.3 ± 6.9	4/8
PVR C	12	58.4 ± 7.3	5/7
PVR D	12	59.1 ± 9.2	9/3
Encircling failure	8	56.9 ± 6.3	3/5
Silicone eyes	8	59.8 ± 8.3	5/3
Normal eyes	8	57.3 ± 5.7	4/4

$F_{age} = 0.850, P = 0.623; \chi^2_{gender} = 5.949, P = 0.429$ (* : ANOVA, #: χ^2 test)

1.2.2 实验仪器 蛋白电泳仪及附件 (7 cm) 和电转仪及附件 (Bio-Rad 公司); Odyssey 红外激光成像系统 (Odyssey 公司); 酶标仪 (GENE 有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫印迹分析检测 IGFBP-6 在样本中的质量浓度 配制 12% SDS-PAGE, 按照实验设计的顺序依次将样品加入上样孔内, 进行 SDS-PAGE 电泳 80 V/30 min, 160 V/1.5 h。将胶上的蛋白质电转到 PVDF 膜上恒流 30 mA/30 min。PVDF 膜封闭 2 h 后加 IGFBP-6 抗体 (1:200) 室温过夜。清洗后加入二抗, 室温孵育 30 min, 避光。清洗后采用 Li-Cor Odyssey 红外激光成像系统扫描。

1.3.2 ELISA 检测 IGFBP-6 在样本中的质量浓度 根据 ELISA 试剂盒说明, 制定标准曲线, 加入 PBS 稀释样本后的样本 100 μL, 加入 50 μL 酶标记液, 37 ℃ 孵育 60 min; 洗板, 加入底物 A 液、B 液各 15 μL, 37 ℃、避光 15 min, 加入 50 μL 终止液, 450 nm 酶标仪读取 OD 值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计分析。测试指标数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同分级的 PVR 玻璃体和血清中 IGFBP-6 质量浓度的比较以及 PVR 患者手术后血清中的 IGFBP-6 与正常人的比较采用单因素方差分析, 组间的两两比较采用 LSD-t 检验。PVR 患者术前及术后 6 个月血清中 IGFBP-6 的比较采用配对 t

检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫印迹分析结果

IGFBP-6 在 PVR 玻璃体中检测到而在正常捐献眼玻璃体中未测到,在 PVR C 级、D 级中的条带明显强于 PVR B 级。同时,该蛋白质可以在对应的 PVR 患者血清样本中检测到,而在正常人的血清中未测到(图 1)。在 24 例 PVR 患者玻璃体和血清样本中,22 例玻璃体和血清样本可以检测到 IGFBP-6(在 2 例 PVR B 级的玻璃体和血清中未测到)。

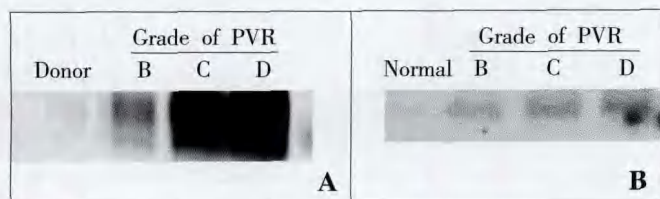


图 1 IGFBP-6 免疫印迹检测结果 供体眼玻璃体和正常人血清中未检测到 IGFBP-6, PVR C 级和 D 级患者 IGFBP-6 条带强于 PVR B 级 A:玻璃体样本 B:血清样本

Fig.1 The Western blotting analysis of IGFBP-6 No IGFBP-6 is detected in vitreous or serum samples in donor eyes and normal population. IGFBP-6 could be detected in both the vitreous and serum samples of the patients with PVR. The band of IGFBP-6 is stronger in grade C and D of PVR than grade B of PVR A:vitreous sample B:serum sample

2.2 ELISA 结果

2.2.1 PVR 患者玻璃体及术前血清中 IGFBP-6 的质量浓度 PVR A、B、C、D 级患者玻璃体中 IGFBP-6 质量浓度的总体比较差异有统计学意义($F = 3.34, P = 0.04$),其中 PVR A 级患者玻璃体中 IGFBP-6 质量浓度低于 PVR B、C、D 级。PVR A、B、C、D 级各组患者血清中 IGFBP-6 质量浓度比较差异无统计学意义($F = 2.14, P = 0.12$)(表 3)。

表 3 不同等级 PVR 玻璃体和术前血清中 IGFBP-6 的质量浓度 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 The concentration of IGFBP-6 preoperatively in vitreous and serum samples in PVR patients (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

Grade of PVR	N	Concentration of IGFBP-6 in different samples	
		Vitreous	Serum
A	8	222.8 ± 26.4	159.8 ± 16.8
B	8	321.6 ± 66.3 ^b	166.2 ± 23.4
C	8	343.6 ± 64.6 ^b	198.0 ± 49.9
D	8	360.7 ± 69.3 ^b	199.9 ± 17.1
F		3.34	2.14
P		0.04	0.12

^b P < 0.05 vs respective PVR A grade (One-way ANOVA, LSD-t test)

PVR 患者血清中的 IGFBP-6 质量浓度 (185.3 ± 34.9) pg/mL 明显低于其玻璃体中的质量浓度 (320.6 ±

73.5) pg/mL, 差异有统计学意义 ($t = 7.95, P = 0.000$)。

将轻度 PVR (A 级、B 级合并) 和严重 PVR (C 级、D 级合并) 比较发现, 严重 PVR 患者和轻度 PVR 患者玻璃体中 IGFBP-6 的质量浓度分别为 (352.9 ± 64.4) pg/mL、(288.3 ± 69.9) pg/mL, 差异有统计学意义 ($t = 5.08, P = 0.036$); 严重 PVR 患者和轻度 PVR 患者血清中 IGFBP-6 的质量浓度分别为 (199.0 ± 35.9) pg/mL、(164.1 ± 20.6) pg/mL, 差异有统计学意义 ($t = 6.96, P = 0.015$)。

2.2.2 PVR 患者手术前后血清中 IGFBP-6 的比较 总体上 PVR 患者术后 6 个月血清中 IGFBP-6 的质量浓度明显下降至 (65.4 ± 31.8) pg/mL, 与术前血清中 IGFBP-6 的质量浓度 (185.3 ± 34.9) pg/mL 相比, 差异有统计学意义 ($t = 11.10, P = 0.00$)。

2.2.3 PVR 患者手术后血清中的 IGFBP-6 质量浓度与正常眼血清的比较 PVR 患者手术后不同状态血清中的 IGFBP 质量浓度亦有差异。玻璃体术后硅油眼的血清中 IGFBP-6 的质量浓度为 (62.5 ± 3.3) pg/mL 与术后 6 个月随访结果 (65.4 ± 31.8) pg/mL 比较差异无统计学意义 ($t = 0.08, P = 0.989$), 与正常对照组 (76.1 ± 17.3) pg/mL 相比差异亦无统计学意义 ($t = 1.59, P = 0.131$), 但明显低于环扎术后未愈组 (109.2 ± 6.6) pg/mL ($t = 3.16, P = 0.009$) (图 2)。

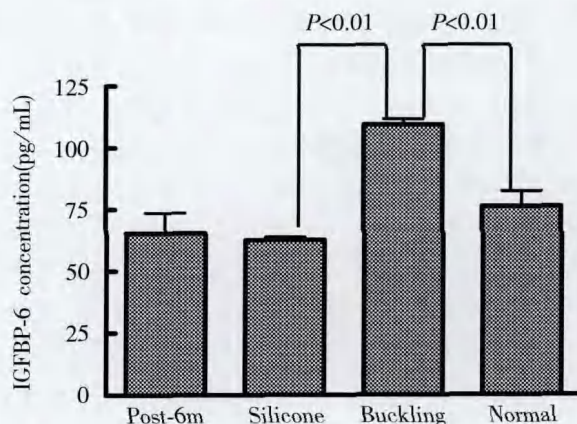


图 2 术后各组患者血清中 IGFBP-6 质量浓度的比较

Fig.2 Comparison of the serum concentration of IGFBP-6 in different groups ($F = 12.69, P = 0.00$) (One-way ANOVA, LSD-t test)

3 讨论

PVR 是导致视网膜脱离手术失败的主要原因之一, 因此一直是眼底病研究的热点。但是目前国际上在临床中对 PVR 的评价缺乏有效的、量化的客观指标。美国视网膜协会将 PVR 分为 A、B、C、D 4 个等级^[3], 比较简单, 因此一直沿用至今。然而, 此标准主

要依据医师的肉眼观察,没有具体的量化评价指标。疾病的分子标志物 (biomarker) 可以作为疾病早期发现的指标;或作为疾病诊断后的疾病分级、严重程度、进展或疾病减轻的指标^[4],因此得到广泛的关注。早在 20 世纪 80 年代,甲胎蛋白用于肝癌的早期诊断和预后评价^[5]。由于血液样本获得容易,同时其高敏感性和特异性,使得这些血清分子标志物临床上检测疾病更加方便、快捷。因此,血清分子标志物的筛选成为疾病研究的重点。

蛋白质组学技术的出现,使疾病分子标志物的筛选水平显著提高。2D-LC-MS/MS 由于其技术对样本量要求不高,检测率高,假阳性率低,可用于翻译后修饰的研究,已被应用于多种疾病的分子标志物的筛选^[6]。

本研究应用免疫印迹分析和 ELISA 研究均证实 IGFBP-6 质量浓度无论是在 PVR 的玻璃体抑或是血清中均与 PVR 严重程度呈正相关,而且玻璃体中的质量浓度明显高于血清,证实玻璃体中的 IGFBP-6 是以自分泌的方式通过血-视网膜屏障进入血液。

IGFBP-6 在哺乳动物中有 IGFBP-1 ~ 6 共 6 个家族成员^[7],是胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 家族的成员之一,参与调控增生和分化。IGFBP-6 在哺乳动物的器官中广泛分布^[8],以自分泌或旁分泌的方式在调控 IGF 的有效性和活性方面起重要作用。由于 IGFBP-6 与 IGF-II 的结合能力是 IGF-I 的 200 倍以上,因此,IGFBP-6 可以与 IGF-II 高度特异性结合并能抑制其功能^[9]。IGF-II 被认为是一种自分泌的肿瘤生长因子^[10],自分泌的 IGFBP-6 与之结合后,有抗增生的功能,抑制 IGF 的丝裂原效应。很多研究证实 IGFBP-6 可以抑制 IGF-II 依赖的癌细胞如横纹肌肉瘤^[11]等的生长。重组的 IGFBP-6 亦可以抑制体外细胞增生,这种效应可以被 IGFBP-6 的抗体所抑制^[12]。研究显示 IGFBP-6 增加的原因可能与低血糖^[13]、维甲酸的刺激^[14]及氧化应激或损伤^[15]有关。

有关 IGFBP-6 参与 PVR 的直接研究尚未见报道。IGFs 对 RPE 细胞影响的研究证实,体外 IGF-I 和 IGF-II 可以启动 RPE 细胞的牵引力^[16]。而玻璃体环境中存在 IGF-I、IGF-II 和 IGFBPs,可以导致 PVR 发生。IGFBPs 对细胞的直接效应是结合蛋白特异的,IGFBP-1 有直接刺激细胞增生的效应,而 IGFBP-3、4、5、6 则有抑制增生的作用。由于 IGFBP-6 是癌细胞程序性死亡的一个强大的诱导者,现在已作为癌症治疗中的一个有希望的靶向^[17]。

本研究不仅发现血清中 IGFBP-6 水平与 PVR 严重程度呈正相关,而且 PVR 患者血清中 IGFBP-6 的质

量浓度在手术后下降至正常,但环扎术后未愈者质量浓度较高。因此,本研究认为 IGFBP-6 可能是评价 PVR 严重程度的一个较理想的指标。是否可以作为临床上评价 PVR 进程和预后的血清分子标志物,尚需进一步进行大规模的临床试验。

参考文献

- 1 Campochiaro PA. Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy [J]. Arch Ophthalmol, 1997, 115: 237 - 241
- 2 Yu J, Liu F, Cui SJ, et al. An analysis of vitreous humor proteome in proliferative vitreoretinopathy patients [J]. Proteomics, 2008, 17: 3667 - 3678
- 3 The Retina Society Terminology Committee. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy [J]. Ophthalmology, 1983, 90: 121 - 125
- 4 Star R, Hostetter T, Hortin GL. New markers for kidney disease [J]. Clin Chem, 2002, 48: 1375 - 1376
- 5 Heyward W, Lanier A, McMahon B, et al. Early detection of primary hepatocellular carcinoma [J]. JAMA, 1985, 254: 3052 - 3054
- 6 Yocum AK, Busch CM, Felix CA, et al. Proteomics-based strategy to identify biomarkers and pharmacological targets in leukemias with t(4; 11) translocations [J]. J Proteome Res, 2006, 5: 2743 - 2753
- 7 Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily [J]. Endocr Rev, 1999, 20: 761 - 787
- 8 Ooi GT, Boisclair YR. Molecular biology of the IGF binding proteins. // Rosenfeld R, Roberts C, eds. The IGF system [M]. New Jersey: Humana Press, 1999: 111 - 139
- 9 Tremblay E, Chailier P, Ménard D. Coordinated control of fetal gastric epithelial functions by insulin-like growth factors and their binding proteins [J]. Endocrinology, 2001, 142: 1795 - 1803
- 10 Götz W, Lossdörfer S, Krüger U, et al. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II and its binding protein-6 in human epithelial cells of Malassez [J]. Eur J Oral Sci, 2003, 111: 26 - 33
- 11 Fu P, Thompson JA, Bach LA. Promotion of cancer cell migration: an insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-6 [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 22298 - 22306
- 12 Koike H, Ito K, Takezawa Y, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 inhibits prostate cancer cell proliferation: implication for anticancer effect of diethylstilbestrol in hormone refractory prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2005, 92: 1538 - 1544
- 13 van Doorn J, Ringeling AM, Shmueli SS, et al. Circulating levels of human insulin-like growth factor binding protein-6 (IGFBP-6) in health and disease as determined by radioimmunoassay [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 1999, 50: 601 - 609
- 14 Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A, et al. Regulation of insulin-like growth factor-binding-protein-1, 2, 3, 4, 5, and 6: synthesis, secretion, and gene expression in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells [J]. J Cell Physiol, 1993, 155: 556 - 567
- 15 Xie L, Tsapralis G, Chen QM. Proteomic identification of insulin-like growth factor-binding protein-6 induced by sublethal H₂O₂ stress from human diploid fibroblasts [J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4: 1273 - 1283
- 16 Mukherjee S, Guidry C. The insulin-like growth factor system modulates retinal pigment epithelial cell tractional force generation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48: 1892 - 1899
- 17 Sueoka N, Lee HY, Wiehle S, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 activates programmed cell death in non-small cell lung cancer cells [J]. Oncogene, 2000, 19: 4432 - 4436

(收稿: 2009-03-26 修回: 2009-06-15)

(本文编辑: 高 红)