

糖尿病角膜结膜上皮病变和血清可溶性 E 选择素相关性研究

唐彦慧 周 炜

Correlation of keratoconjunctival epithelium and soluble E-selectin in type 2 diabetic patients

Tang Yanhui, Zhou Wei. Department of Ophthalmology, First People's Hospital of Nanning, Nanning 530022, China

Abstract Objective Diabetes mellitus is a syndrome characterized by hyperglycemia leading to associated microvascular or macrovascular complications. The goal of this study was to explore the relationship between the change of keratoconjunctival epithelium and soluble E-selectin level. **Methods** Fifty eyes of 25 cases with type 2 diabete and 50 eyes of 25 healthy subjects with matched age and gender were included in this study. Schirmer-I test, tear film break-up time(BUT), fluorescein vital staining (FL) were performed in all subjects, and conjunctival impression cytologic analysis(IC) was selected for the evaluation of corneal goblet cell density. The correlation of age, duration, the grade of diabetic retinopathy and the level of soluble E-selectin in the periphery blood were assessed by Spearman correlation analysis and multiple regression analysis. **Results** The mean BUT, Schirmer- I value, and conjunctival goblet cell density were significantly lower than healthy subjects($P < 0.05$). Average score of FL and the grade of conjunctival squamous metaplasia were higher than healthy subjects with significant difference($P < 0.05$). The conjunctival goblet cell density and the grade of conjunctival squamous metaplasia were significantly correlated to soluble E-selectin($r = -0.533, r = 0.707, P < 0.05$). **Conclusion** Type 2 diabete is complicated by abnormality of tear-film and keratoconjunctiva. The higher level of soluble E-selectin is associated with the decrease of conjunctival goblet cell density and the degree of conjunctival squamous metaplasia.

Key words diabetes mellitus; tear-film; keratoconjunctiva epithelium; soluble E-selectin

摘要 目的 探讨糖尿病(DM)角膜结膜上皮改变的情况及其与血清可溶性 E 选择素之间的相关性。**方法** 分别测定 25 例(50 眼) 2 型糖尿病患者和 25 例(50 眼)健康对照组泪膜破裂时间(BUT)、基础泪液分泌试验(Schirmer I)、角膜荧光素染色(FL)、结膜印记细胞学(IC)检查,并将检测结果与年龄、DM 病程、糖尿病视网膜病变(DR)、血清 E-选择素等进行相关分析。**结果** DM 组的 BUT 值、Schirmer I 值、结膜杯状细胞密度均低于对照组,角膜上皮荧光素染色着色率、结膜鳞状上皮化生级别高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。DM 组的结膜杯状细胞密度和鳞状上皮化生的级别与血清可溶性 E 选择素有显著相关性($P < 0.01$)。**结论** DM 患者泪膜功能和角结膜上皮均有损害,且血清 E 选择素水平高者,结膜杯状细胞密度下降愈明显,上皮细胞鳞状化生程度愈高。

关键词 糖尿病; 泪膜; 角膜结膜上皮; 血清可溶性 E 选择素

分类号 R 772.2 R 777.3 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0416-04

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是对眼部造成并发症较多的一种代谢性疾病,最近几年对 DM 眼表病变的损害进行了较多的研究^[1]。本研究了解 DM 对眼表损害的程度,及这些损害与血清 E 选择素之间的相

关性,为防治 DM 眼表病变提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2 型 DM 患者 25 例(50 眼)为 DM 组,其中男 13 例(26 眼),女 12 例(24 眼),均为本院确诊为 DM 的住院患者。对照组 25 例(50 眼),均为健康体

本课题为南宁市科学研究与技术开发计划项目资助(20060167c)
 作者单位:530022 南宁市第一人民医院眼科
 通讯作者:唐彦慧(Email:tyh0416@163.com)

检者,男 12 例(24 眼),女 13 例(26 眼);年龄 ≤ 65 岁。DM 组年龄为(55.30 \pm 9.29)岁,对照组为(52.08 \pm 8.8)岁,2 组的性别(χ^2 检验, $P=0.279$)、年龄(Mann-Whitney U 检验, $P=0.234$)构成比差异无统计学意义(表 1)。

表 1 2 组患者的人口基线特征比较

Table 1 Comparison of demography between DM group and control group

Group	N	Sex*		Age*		
		Man	Female	Young	Old	Average
DM	50	26	24	25	65	55.30
Control	50	24	26	37	65	52.08
P		0.027		0.234		

*: χ^2 test, #: Mann-Whitney test

排除标准:眼部急性感染者(包括外界因素所致角膜病变,如异物、电光性眼炎等)、眼睑及眼球位置异常者、眼部手术者、2 周内滴用阿托品、噻吗心安滴眼液者、严重干眼症患者。

1.2 方法

1.2.1 一般项目检查 询问病史,查询专科病历,检查视力、眼压、裂隙灯、眼底。

1.2.2 泪膜破裂时间(tear film break-up time, BUT)

以一次性定量取血管吸取 1% 荧光素钠 1 滴于下睑结膜囊内,眨眼数次后,嘱患者适当延长睁眼时间,用裂隙灯的钴蓝光(光带宽 3 mm)往返观察角膜前泪膜,从瞬目后睁眼时开始用秒表计时,至荧光素染色的泪膜表面出现第 1 个干斑,即为 BUT。重复测量 3 次,取其平均值。

1.2.3 泪液分泌试验(Schirmer I) 采用 5 mm \times 3.5 mm 滤纸条,测量时患者不滴用表面麻醉剂,将滤纸一端反折,轻置于下睑中外 1/3 结膜囊内,嘱患者轻轻闭眼,5 min 后取出滤纸条,从折叠处计算并记录滤纸的湿润长度(mm)。

1.2.4 角膜荧光素染色(fluorescein vital staining, FL)^[1] 用 2% 荧光素钠滴眼液(医院制剂室配制)一滴滴于结膜囊内,观察角膜 FL 情况,用 0.25% 的氯霉素滴眼液冲洗多余的荧光素,并在裂隙灯钴蓝光下观察。将角膜划分为 4 个象限,每个象限根据染色程度和染色面积评分:荧光素无染色者为阴性;FL 阳性仅占角膜 1 个象限或 ≤ 5 个染色点者为(+);FL 阳性占角膜 2 个象限或者 6~15 个染色点者为(++);FL 阳性占角膜 3 个象限或者 16~25 个染色点者为(+++);FL 阳性占角膜 4 个象限或者 ≥ 26 个染色点者为(++++)。

1.2.5 结膜印迹细胞学(impression cytologic, IC) 检查 将醋酸纤维素膜剪成 2 mm \times 15 mm 的小片,将其粗糙面放置于研究对象颞侧球结膜表面 2~3 s 后取下,将薄膜放入 95% 乙醇固定液中固定,过碘酸希夫和苏木精-伊红染色、乙醇脱水、二甲苯透明处理,光学显微镜下观察。分析指标为结膜上皮鳞状化生程度、杯状细胞密度等变化指标。鳞状化生分级采用改良 Nelson 分级^[2]。结膜上皮杯状细胞密度记数方法,采用测微器在 40 倍显微镜下,记数 5 个高倍视野范围内杯状细胞数,取其平均数。如 2 眼级别不同时,取严重眼的级别作为统计。根据结膜上皮细胞形态及杯状细胞的数量和分布,将 IC 的标本进行分级:0 级:上皮细胞圆小,核大,核质比约为 1/2。杯状细胞丰富,呈卵圆形,过碘酸希夫染色强阳性。1 级:上皮细胞较大,多角形,核小核质比约为 1/3,杯状细胞数量减少,但仍过碘酸希夫染色强阳性的卵圆形。2 级:上皮细胞大,多角形,有时有多个核。核小,核质比为 1/4~1/5。杯状细胞显著减少,过碘酸希夫染色弱,边界不清。3 级:上皮细胞大,多角形,核小,圆缩,许多细胞核消失。核质比为 1/6。几乎找不到杯状细胞。

1.2.6 血清可溶性 E 选择素检测 空腹抽静脉血 3 mL,分离血清后放至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待检。ELISA 法测定血清中的血清可溶性 E 选择素,试剂盒为美国 RapidBio Lab 公司产品,采用美国 Wallac1420 Explorer 酶标仪测定,并根据绘制的标准曲线求出相应标本的血清浓度。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 10.0 统计学分析软件进行统计学处理,DM 组和对照组的年龄差异比较采用 Mann-Whitney U 检验,性别差异比较及各检查指标异常的频数分布采用 χ^2 检验或 Mann-Whitney 检验,角膜荧光染色、BUT 值、Schirmer I 值,指标以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 个组间各测试指标的差异采用独立样本 t 检验;结膜印迹细胞学检查分级采用 Mann-Whitney 检验,对检测指标值与年龄、DM 病程、糖尿病视网膜病变和血清 E 选择素之间的相关性进行 Spearman 等级相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泪膜破裂时间

DM 组 BUT 值 < 10 s 者 49 眼(98.0%),对照组 42 眼(84.0%),两者之间的差异有统计学意义($\chi^2=5.983$, $P=0.014$)。DM 组平均 BUT 值为(4.56 \pm

2.02)s, 对照组为(6.76 ± 4.11)s, DM 组 BUT 值较对照组明显缩短(P=0.001)(表 2,3)。

2.2 泪液分泌试验

DM 组 Schirmer I <5 mm 的有 33 眼(66.0%), 对照组 Schirmer I <5 mm 有 15 眼(30.0%), 差异有统计学意义(χ² = 12.981, P = 0.000)。DM 组的 Schirmer I 值为(4.52 ± 2.84) mm, 对照组为(6.28 ± 3.65) mm, DM 组的 Schirmer I 值较对照组明显减少(P=0.008)(表 2,3)。

2.3 角膜荧光素染色

DM 组 FL 29 眼, 阳性率 58.0%, 对照组染色 13 眼, 阳性率为 26.0%, 两者之间的差异有统计学意义(χ² = 10.509, P = 0.001)。DM 组的角膜染色程度多于对照组, 2 组之间的差异有统计学意义(U = 15.537, P = 0.004)(表 2,3)。

表 2 DM 组和对照组 BUT、Schirmer I 和角膜 FL 异常的频数分布(n, %)

Table 2 The frequency of BUT, Schirmer I and corneal fluorescence staining abnormality in two groups(n, %)

Group	N	BUT*	Schirmer I *	Fluorescence staining*
DM	50	49(98)	33(66)	29(58)
Control	50	42(84)	15(30)	13(26)
P		0.014	0.000	0.001

* :χ² test, #:Mann-Whitney U test

表 3 DM 组和对照组 BUT、Schirmer I、角膜 FL 和结膜杯状细胞密度的比较(χ ± s)

Table 3 Comparison of BUT, Schirmer I, corneal fluorescence staining and goblet cell density between two groups(χ ± s)

Group	N	BUT(s)	Schirmer I (mm)	Goblet cell density
DM	50	4.56 ± 2.02	4.52 ± 2.84	10.28 ± 8.81
Control	50	6.76 ± 4.11	6.28 ± 3.65	41.72 ± 29.38
t		-3.394	-2.69	-7.247
P		0.001	0.008	0.000

(Student's t test)

2.4 结膜 IC 检查

DM 组结膜上皮细胞鳞状化生的级别比对照组高(U = 52.685, P = 0.000), 表现为对照组上皮细胞圆形, 核大; DM 组上皮细胞大, 多角型, 核小, 核浆比增大。DM 组的每个高倍视野的杯状细胞数为(10.28 ± 8.81) 个, 对照组的每个高倍视野的杯状细胞数为(41.72 ± 29.38) 个, DM 组的杯状细胞数明显少于对照组(P = 0.000)(表 4)。

2.5 sE 选择素的结果

DM 组的 sE 选择素的值为(56.79 ± 29.13) ng/mL, 对照组为(26.34 ± 16.19) ng/mL, 2 组差异有统计学

表 4 DM 组与对照组印记细胞学检查结果(Nelson 分级)

Table 4 Comparison of the grade of conjunctival squamous metaplasia between two groups(Nelson's criteria)

Group	N	Grade of conjunctival squamous metaplasia			
		0	1	2	3
DM		1	15	21	13
Control		31	15	4	0

U = 52.685, P = 0.000(Mann-Whitney U test)

意义(P = 0.000)。

2.6 DM 组的眼表改变指标与各因素的关系

角膜染色程度与泪液基础分泌成负相关, 泪液分泌越少, 角膜着色程度越重。结膜鳞状上皮化生程度与血清可溶性 E 选择素呈正相关, 即血清可溶性 E 选择素水平越高, Nelson 分级级别越高, 结膜鳞状上皮化生程度越重(表 5)。

表 5 角膜染色着色评分和结膜鳞状上皮化生分级与其他因素的相关性

Table 5 Correlation between some factor and corneal fluorescence staining or grade of conjunctival squamous metaplasia

Factor	Correlation coefficient(r)			
	Corneal fluorescence staining	P	Grade of conjunctival squamous metaplasia	P
Age	-0.272	0.189	-0.061	0.772
Duration	0.268	0.087	-0.131	0.408
BUT	0.269	0.093	-0.205	0.204
Schirmer I	-0.340	0.028	-0.093	0.560
S-selectin	-0.079	0.620	0.707	0.000

2.7 杯状细胞密度与其他因素的关系

经多因素相关分析显示, 杯状细胞密度与血清可溶性 E 选择素的水平呈显著负相关(r = -0.533, P = 0.000), 血清可溶性 E 选择素的水平越高, 杯状细胞密度越低。

3 讨论

DM 是一组由遗传和环境因素相互作用而引起的临床综合征, DM 患者发生干眼的机制目前尚不清楚。本课题对 DM 患者进行了泪膜功能、结膜印记细胞学、sE-选择素等指标的研究。

随着年龄的增加, 泪液分泌将减少, 我们选择病例时, 均选择年龄小于 65 岁的病例为研究对象, 以排除由于年龄增长造成泪液分泌减少的影响。DM 组的 BUT 和 Schirmer I 的值均小于对照组。国内外大量研究^[3-5]均认为 DM 患者的基础泪液分泌量减少, 泪膜稳定性下降, 考虑 DM 患者泪膜功能的改变与许多因素有关^[6-9], 较同龄人相比更容易出现干眼。

DM 组病例中角膜上皮染色阳性率高于对照组,

严重程度也重于对照组。DM 损害角膜上皮的结构与功能,高糖状态起关键作用,而且这种作用也是多层次、多方面的^[10]。我们对角膜上皮染色严重程度和年龄、DM 的病程、泪膜稳定性、泪液分泌量及血清的 E 选择素进行了相关性分析,我们的研究结果是角膜上皮染色严重程度与泪液分泌的量有相关性,泪液分泌越少,角膜上皮由于失去泪液的润泽和营养,脆性大,越容易出现脱落。对于这些角膜上皮异常的患者,我们均给与人工泪液点眼,并且叮嘱患者半年后复诊。

我们观察的血清可溶性 E 选择素的水平 DM 组的高于对照组,这与许多近年来研究细胞因子的文献报道的结果相一致^[11-12]。E-选择素是黏附分子选择素家族中的重要成员,因其最先发现于内皮细胞而得名,血清中血清可溶性 E 选择素水平反映了体内血管内皮细胞的活化状态,以往研究表明,高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗均会导致其升高,更敏感地反应了内皮细胞的活跃程度,是一个非特异性反应内皮损害和应激状态的标志物,降低血糖浓度可以使可溶性 E 选择素浓度降低。E 选择素的检测已经成为肿瘤、心脑血管疾病、肺部疾病、DM 的研究热点^[13]。

DM 组的印记细胞学检查提示 DM 组的病例的结膜上皮细胞鳞状化生增加,杯状细胞数目较对照组减少,并且结膜上皮细胞鳞状化生的程度及杯状细胞密度减少的程度与病程、泪膜稳定性、视网膜病变等无关,而与血清可溶性 E 选择素有关。结膜杯状细胞作为眼部单细胞黏液腺,在维持眼表稳定性、润滑及保护眼表等方面起重要作用^[14],因此 DM 的病例泪膜稳定性较未患 DM 的病例差的原因之一与结膜杯状细胞密度减少有关。我们的研究表明眼表杯状细胞密度和结膜上皮细胞鳞状化生程度与 E 选择素有关,DM 组的可溶性 E 选择素越高,结膜鳞状上皮化生越重,杯状细胞密度下降越明显。E 选择素作为唯一仅限于内皮细胞表面表达的黏附分子,具有组织特异性和细胞因子可诱导性,近年成为研究的热点。很多研究^[15-17]提出杯状细胞的增生和分泌受到多种因素的调节,如神

经调节、生长因子和激素等,本研究结果是否也提示了杯状细胞的增生和分泌也受到了 E 选择素的调节,有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 金姬,陈丽红,刘秀伦,等. DM 患者泪膜功能的研究[J]. 中华眼科杂志,2003,39(1):10-13
- 2 Nelson DJ. Impression cytology[J]. Cornea,1988,7(1):71-81
- 3 Grus FH, Sabuncuo P, Dick HB, et al. Changes in the tear proteins of diabetic patients[J]. BMC Ophthalmol,2002,2:4
- 4 Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, et al. Corneal nerve tortuosity in diabeted pafien with neuropathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2004,45(2):418-422
- 5 Tavakoli M, Kallinikos PA, Efron N, et al. Corneal sensitivity is reduced and relates to the severity of neuropathy in patients with diabetes[J]. Diabetes Care,2007,30:1895-1897
- 6 Creuzot-Garcher C, Lafontaine PO, Gualino O, et al. Study of ocular surface involvement in diabetic patients[J]. J Fr Ophthalmol,2005,28(6):583-588
- 7 Yoon KC, Im SK, Seo MS. Changes of tear film and ocular surface in diabetes mellitus[J]. Korean J Ophthalmol,2004,18(2):168-174
- 8 Seifart U, Stempel I. The dry eye and diabetes mellitus [J]. Ophthalmologe,1994,91(2):235-239
- 9 李海燕,庞国祥,许卓再. 2 型糖尿病患者的泪膜功能[J]. 中国医学科学院学报,2004,26(6):682-686
- 10 朱妹. 糖尿病角膜上皮和泪膜改变的研究进展[J]. 眼科新进展,2007,27(4):318-320
- 11 Zheng HT, Zhou LN, Huang CJ, et al. Selenium inhibits high glucose- and high insulin-induced adhesion molecule expression in vascular endothelial cells[J]. Arch Med Res,2008,39(4):373-379
- 12 Bláha V, Andrys C, Smahelová A, et al. Effect of atorvastatin on soluble CD14, CD40 ligand, sE- and sP-selectins and MCP-1 in patients with type 2 diabetes mellitus; relationship to cholesterol turnover [J]. Pharmacol Res,2006,54(6):421-428
- 13 唐彦慧. E-选择素与糖尿病血管病变相关性的研究现状[J]. 广西医学,2007,29(3):36-37
- 14 Goebbels M. Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics[J]. Br J Ophthalmol,2000,84(1):19-21
- 15 Horikawa Y, Shatos MA, Hodges RR, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase by cholinergic agonists and EGF in human compared with rat cultured conjunctival goblet cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44(6):2535-2544
- 16 Shatos MA, Ríos JD, Horikawa Y, et al. Isolation and characterization of cultured human conjunctival goblet cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44(6):2477-2486
- 17 Jousen AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44:117-123

(收稿:2008-08-17 修回:2009-04-15)

(本文编辑:高红)

读者·作者·编者

本刊对图表的要求

表格采用三线表,表内容用英文;表题用中、英两种文字且中文在上,英文在下,分别用表 1、表 2 和 Table 1, Table 2 列于表上方;只有 1 个表格者标为表 1。照片少而精,可保留 4~6 幅。彩色、黑白均可,图像清晰,对比度好,尺寸一致,需说明的阳性指征应加箭头或字母,照片背面注明作者姓名、图序及上下方向。线条图和照片的图题和图说明用中英两种文字,用图 1、图 2 和 Fig. 1, Fig. 2 列于图下方,且中文在上,英文在下;只有一幅图者标为图 1。图中需要文字说明处用英文。

(本刊编辑部)