

外周血单核细胞表达 PEDF 在 2 型糖尿病视网膜病变中的意义

吕秋菊¹, 唐喜香², 文哲瑶¹, 王曼曼¹, 穆攀伟¹, 舒 囡¹, 陈燕铭^{1, 2*}
(中山大学附属第三医院 1. 内分泌与代谢病科; 2. 特诊医疗中心, 广东广州 510630)

摘要:【目的】色素上皮衍生因子(PEDF)通过抗血管增生、抗炎、抗氧化应激等影响糖尿病视网膜病变(DR)发生发展,而单核/巨噬细胞(CD14⁺)与慢性炎症关系密切。本研究拟通过观察外周血 CD14⁺细胞中 PEDF 的表达水平,为进一步探讨 DR 发病机制提供线索。【方法】选取 2011 年 10 月~2013 年 4 月在我院内分泌科住院确诊为 2 型糖尿病患者(DM 组)108 例,分为无糖尿病视网膜病变组(NDR 组)52 例和糖尿病视网膜病变组(DR 组)56 例,同期健康体检者作为对照组(NC 组)52 例。收集患者外周血白细胞及其分类细胞计数相关指标;密度梯度离心法收集患者 PBMC,免疫磁珠分离法提取 CD14⁺ 细胞;剩余 PBMC 提取总蛋白,western blot 比较总 PBMC(tPBMC)与分离掉 CD14⁺ 细胞的 PBMC[PBMC(exCD14⁺)]中 PEDF 蛋白表达水平。【结果】DR 组和 NDR 组单核细胞绝对值较 NC 组升高($P < 0.05$),但 DR 组和 NDR 组间单核细胞绝对值的差异无统计学意义($P > 0.05$);DR 组淋巴细胞绝对值较 NDR 组明显减低($P < 0.05$);与 tPBMC 相比,PBMC(exCD14⁺)中 PEDF 蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$)。【结论】DR 患者外周血单核细胞数量增加。单核细胞是 PBMC 中表达 PEDF 的主要细胞。

关键词:色素上皮衍生因子;糖尿病视网膜病变;外周血单个核细胞;单核/巨噬细胞
中图分类号:R **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2015)01-0114-06

Level of PEDF Increased in Monocytes in Diabetic Retinopathy

LV Qiu-ju¹, TANG Xi-xiang², WEN Zhe-yao¹, WANG Man-man¹, MU Pan-wei¹, SHU Jiong¹, CHEN Yan-ming^{1,2*}
(1. Department of Endocrinology & Metabolism; 2. Advanced Medical Center, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding author: CHEN Yan-ming, E-mail: yanmingch@qq.com

Abstract: 【Objective】 Pigment epithelium derived factor (PEDF) has been widely implicated in Diabetic retinopathy (DR) via inhibition of angiogenesis and inflammation. Monocyte/macrophage (CD14⁺ cell) is closely associated with chronic inflammation. The present study is aimed to investigate whether PEDF is mainly expressed in monocytes in DR patients. 【Methods】 Type 2 diabetic patients served as DM group ($n = 108$), which were sub-divided into non-diabetic retinopathy group (NDR group, $n = 52$) and diabetic retinopathy group (DR group, $n = 56$) by angiography. 52 healthy persons were enrolled in the study as normal control group (NC group). CD14⁺ cells were isolated from PBMC using density-gradient centrifugation and immunomagnetic beads. The protein level of PEDF in the tPBMC and PBMC (exCD14⁺) was determined by western blot. The content of white blood cell count was measured. 【Results】 The counts of monocytes were similar in NDR and DR groups ($P > 0.05$) but lower in NC group ($P < 0.05$). The counts of lymphocytes in DR groups were lower in NDR groups ($P < 0.05$). The level of PEDF in PBMC excluding CD14 positive cells was significantly lower than that of total PBMC ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Monocytes are the main cells to secrete PEDF in PBMC.

Key words: pigment epithelium-derived factor; diabetic retinopathy; peripheral blood mononuclear cells; monocytes/macrophages

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(1): 114-119]

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2011B031800155); 广东省自然科学基金资助项目(S2011010004811); 广东省自然科学基金项目(S2013010015931)

作者简介: 吕秋菊, 硕士研究生, E-mail: lvqiuju@mail2.sysu.edu.cn 作者现工作单位: 四川省乐山市人民医院内分泌科; * 通信作者: 陈燕铭, 医学博士, 硕士研究生导师, 内分泌科主任医师; E-mail: yanmingch@qq.com

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的微血管并发症,是导致成人失明的主要原因^[1]。大量研究表明,低度、慢性炎症在糖尿病视网膜病变发病过程中起重要作用^[2]。而巨噬细胞与慢性炎症密切相关。巨噬细胞是单核细胞在组织中的名称,二者为同一类细胞;因组织中的巨噬细胞增殖潜力很小,主要由外周血单核细胞补充。单核/巨噬细胞的特异表面分子标记物是CD14^[3]。有研究^[4]发现在DR小鼠玻璃体内注入CD14⁺细胞后,小鼠视网膜血管闭塞及新生明显减少,这提示单核/巨噬细胞在DR发病过程中起重要作用。色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)是一种分子量为50ku的分泌型糖蛋白,被认为是影响DR发生发展的重要因子。我们的前期研究首次观察到2型糖尿病患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)可表达PEDF,并且在DR患者表达增加^[5]。PBMC主要由外周血中单核细胞、淋巴细胞构成,单核细胞是PBMC的重要构成成分。目前尚无关于PBMC中单核细胞PEDF分泌的研究。本研究旨在探讨2型糖尿病DR患者外周血单核细胞与淋巴细胞PEDF表达的差异,明确在2型糖尿病DR患者中PEDF的来源,为研究DR发病机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 研究对象与分组

选取2011年10月~2013年4月在我院内分泌科住院的2型糖尿病患者(DM组)108例,其中男55例,女53例,年龄(59.3 ± 9.7)岁,糖尿病诊断符合WHO 1999年标准。根据眼底荧光血管造影和眼底检查结果,分为糖尿病不合并视网膜病变组(NDR组)52例,其中男30例,女22例,年龄(56.3 ± 7.1)岁,糖尿病合并视网膜病变组(DR组)56例,其中男25例,女31例,年龄(62.2 ± 10.9)岁。同期选取健康体检者52例为正常对照组(NC组),男23例,女29例,年龄(56.4 ± 11.8)岁,无心脏病、高血压,口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)排除糖尿病。所有研究对象均无明确的心、肝、肺及肾脏疾病,排除急、慢性感染性疾病及恶性肿瘤等。

1.2 材料与试剂

Lymphoprep人淋巴细胞分离液购自达科为公司;细胞裂解液购自广州捷倍斯公司;磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自Pierce公司;PVDF膜购自Millipore公司; β -actin单抗购自Cell Signaling Technology公司;兔抗人PEDF多抗购自Santa Cruz公司;荧光标记的羊抗兔II抗购自美国Odyssey公司;人CD14正选磁珠购自美国BD公司;人CD14流式抗体及同型IgG抗体购自美国eBscience公司。

1.3 生化指标及血常规检测

采用自动化血液分析仪检测血常规,取空腹静脉血清检测空腹血浆葡萄糖(fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-c)、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin A1C, HbA1c)。

1.4 PBMC中PEDF蛋白水平的Western blot分析

收集病人清晨空腹静脉血3 mL, 2 h内以Ficoll淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离PBMC,加入细胞裂解液后,4℃($16\ 000 \times g$)离心15 min取上清液即可得总蛋白,BCA法测蛋白浓度,配平蛋白浓度。每样品取15 μ L上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)约2 h,用电转移法将蛋白转移至PVDF膜上,50 g/L的脱脂奶粉或50 g/L的BSA室温封闭2 h,加入I抗[兔抗人PEDF多抗、兔抗人 β -actin单抗(1:1500)]4℃过夜。经荧光标记的羊抗兔II抗(1:10000)室温孵育1 h后洗膜,将膜置于Odyssey近红外光荧光扫描仪上进行扫描。以目的蛋白与 β -actin条带吸光度值之比表示目的蛋白表达水平。

1.5 CD14⁺细胞提取

按前述PBMC分离方法超净台分离获得PBMC细胞,加入10 μ L BD磁珠与PBMC沉淀重悬混匀后,孵育30 min后将细胞移入磁珠分选管,加入700 μ L PBS溶液重悬,将磁珠分选管置于BD磁力架上,静置10 min后小心吸干液体,收集液体中的细胞。移出分选管,再往里加入700 μ L PBS溶液,重悬,放回磁力架静置4 min后小心吸出液体,收集液体中的细胞。重复前述步骤,吸出液体后分选管内剩余的细胞即为CD14⁺

细胞。将每次吸出的液体离心,获得不含 CD14⁺细胞的PBMC,提取总蛋白后保存于-80℃冰箱备用。

1.6 流式细胞术检测 CD14⁺细胞纯度

将上述分离所得的 CD14⁺细胞平均分配到标记为 1、2 的 2 支流式检测管中。管 1 加入同型对照 IgG,管 2 加入 CD14 抗体,均为 PE 荧光标记,涡旋混匀后,4℃避光静置 30 min,2 管内均加入 1 mL PBS 溶液,重悬洗涤后倒弃上清,加入 200 μL PBS 溶液,重悬,上机检测。

1.7 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 13.0 分析处理,计数资料用卡方检验,计量资料行正态性检验,符合正态分布的数据以均数 ± 标准差(mean ± SD)表示,非正态数据以中位数 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。符合正态分布、方差齐的数据,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性采用 Pearson 相关分析。非正态分布或方差不齐的数据间比较采用秩和检验,相关性采用 Spearman 相关分析。两相关系数的比较采用公式^[6]计算:

$$Z = \frac{\frac{1}{2} \ln \frac{1+\gamma_1}{1-\gamma_1} - \frac{1}{2} \ln \frac{1+\gamma_2}{1-\gamma_2}}{\sqrt{\frac{1}{n_1-3} - \frac{1}{n_2-3}}}$$

根据 Z 值查标准正态分布(Z -分布)密度曲线下面积表,进行统计推断。各指标对血浆 PEDF 水平的影响采用多重线性回归分析。 $P < 0.05$ (双侧)视为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组临床资料及生化指标

三组间年龄、性别无统计学差异($P > 0.05$)。三组间 TC、LDL-c 的水平无统计学差异($P > 0.05$)。NDR 组和 DR 组的 TG、HDL-c、HbA1c 和 FBG 水平较 NC 组高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 DR 组 HbA1c 和 FBG 较 NDR 组低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

2.2 外周血白细胞及其分类细胞计数

NDR 组与 DR 组白细胞计数(white blood cell, WBC)水平较 NC 组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DR 组和 NDR 组的单核细胞绝对值较 NC 组高,差异有统计学意义($P < 0.05$);DR 组单核细胞绝对值较 NDR 组高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。NDR 组淋巴细胞绝对值较 NC 组高,差异有统计学意义($P < 0.05$);DR 组淋巴细胞绝对值较 NDR 组低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

2.3 外周血白细胞计数与其分类细胞计数的相关性

NC 组、DM 组外周血白细胞计数与单核细胞绝对值、淋巴细胞绝对值均呈正相关关系,见图 1。DM 组外周血白细胞计数(WBC)与单核细胞绝对值的相关系数($r = 0.69, P < 0.05$)高于 NC 组($r = 0.57, P < 0.05$),见图 1A、1B。而 DM 组外周血白细胞计数与淋巴细胞绝对值相关系数($r = 0.22, P < 0.05$)低于 NC 组($r = 0.52, P < 0.05$),见图 1C、

表 1 各组临床资料及生化指标

Table 1 Clinical characteristics among the three groups

Group	NC group($n = 52$)	NDR group($n = 52$)	DR group($n = 56$)	P value
Age(year)	56.4 ± 11.8	56.3 ± 7.1	62.2 ± 10.9	0.053
Male/Female	23/29	30/22	25/31	0.291
TC(mmol/L)	4.90 ± 0.77	5.04 ± 1.03	4.97 ± 1.28	0.797
TG(mmol/L)	1.00 (0.79, 1.29)	1.52(1.27, 2.78) ¹⁾	1.57(1.09, 2.11) ¹⁾	0.014
HDL-c(mmol/L)	1.46 ± 0.28	1.18 ± 0.57 ²⁾	1.10 ± 0.28 ²⁾	<0.001
LDL-c(mmol/L)	2.76 ± 0.62	3.15 ± 0.95	3.08 ± 1.09	0.077
FBG(mmol/L)	5.09 ± 0.42	13.25 ± 5.63 ³⁾	10.72 ± 6.22 ²⁾³⁾	<0.001
HbA1c(%)	5.29 ± 0.34	10.91 ± 2.79 ²⁾	8.88 ± 2.67 ²⁾⁴⁾	<0.001

TC: total cholesterol; TG: triglycerides; HDL-c: high density lipoprotein; LDL-c: low density lipoprotein; FBG: Fasting blood glucose; HbA1c: glycated hemoglobin A1C; NC: normal control; NDR: non-diabetic retinopathy; DR: diabetic retinopathy; 1) $P < 0.05$ vs NC group; 2) $P < 0.01$ vs NC group; 3) $P < 0.05$ vs NDR group; 4) $P < 0.01$ vs NDR group.

表 2 各组单核细胞和淋巴细胞指标

Table 2 Counts of monocytes and lymphocyte among the three groups

	NC group(<i>n</i> = 52)	NDR group(<i>n</i> = 52)	DR group(<i>n</i> = 56)	<i>P</i> value
WBC($\times 10^9/L$)	6.10 \pm 1.52	7.20 \pm 2.01 ¹⁾	7.25 \pm 2.60 ¹⁾	0.004
MONO($\times 10^9/L$)	0.356 \pm 0.140	0.438 \pm 0.191 ¹⁾	0.467 \pm 0.262 ¹⁾	0.018
MONO(%)	0.059 \pm 0.018	0.061 \pm 0.021	0.065 \pm 0.021	0.258
LYMPH($\times 10^9/L$)	1.949 \pm 0.561	2.264 \pm 0.764 ¹⁾	1.922 \pm 0.623 ²⁾	0.016
LYMPH(%)	0.335 \pm 0.074	0.323 \pm 0.089	0.291 \pm 0.096 ¹⁾	0.026

WBC: white blood cell; MONO: monocyte; LYMPH: lymphocyte; NC: normal control; NDR: non-diabetic retinopathy; DR: diabetic retinopathy; 1) $P < 0.05$ vs NC group; 2) $P < 0.05$ vs NDR group.

1D。DM 组($r = 0.69$)WBC 与单核细胞绝对值相关性高于 NC 组($r = 0.57$),差异无统计学意义($P > 0.05$),需要进一步扩大样本量研究分析;而 DM 组($r = 0.22$)WBC 与淋巴细胞绝对值相关性低于 NC 组($r = 0.52$),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 CD14⁺细胞提取纯度测定

通过免疫磁珠分选法采集的细胞,经流式细胞仪检测 CD14⁺细胞所占比例为 97.44%。见图 2。

2.5 tPBMC 与 PBMC(exCD14⁺)中 PEDF 蛋白表达

与总 PBMC(total PBMC, tPBMC)相比,去除 CD14⁺细胞的 PBMC[PBMC(exCD14⁺)]PEDF 蛋白表达水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 PBMC 中 PEDF 的主要来源是 CD14⁺细胞(图 3)。

3 讨论

PBMC 是外周循环中含有单个核的细胞,是外周血白细胞的重要组成部分,主要包括淋巴细胞和单核细胞,占 PBMC 的 95%以上,是免疫系统的重要

组成部分,常用于自身免疫性疾病、炎症性疾病的研究。本课题前期研究观察到糖尿病患者外周血白细胞计数显著高于正常人群,提示糖尿病患者处于炎症状态^[5]。既往有研究发现糖尿病患者外周血单核细胞数量增加,且糖尿病肾病患者单核细胞数量高于不伴肾病患者^[7-8]。本研究发现 DR、NDR 组患者外周血单核细胞数量明显高于 NC 组,而 DR 患者外周血淋巴细胞数量明显低于 NDR 组;而且发生糖尿病时,单核细胞而非淋巴细胞与 WBC 升高有密切关系。这提示单核细胞而非淋巴细胞的增多与糖尿病及其视网膜并发症的炎症状态相关。这与既往研究结果相似。其可能机制为单核/巨噬细胞系统是固有免疫的主要组成部分,机体发生损伤时,巨噬细胞迅速聚集到损伤处,吞噬异物并产生相应的细胞因子抵御损伤。长期高血糖的不良刺激,通过多种途径作用于视网膜微血管,引起毛细血管闭塞,视网膜局部血流动力学异常。由于损伤持续存在,对单核/巨噬细胞的需求增加,机体仍动员骨髓释放大量单核细胞,从而导致外周血单核细胞数量增加。

本研究从 PBMC 分离出 CD14⁺细胞,通过比较

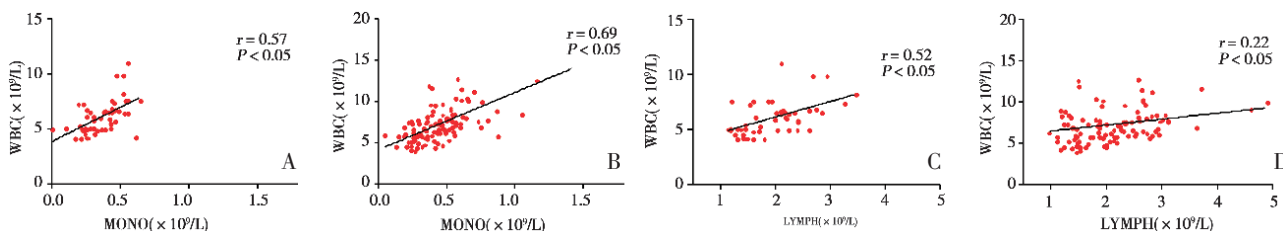


图 1 WBC 与 MONO、LYMPH 的相关性分析

Fig.1 Correlation between levels of WBC and MONO, LYMPH

A: correlation between levels of WBC and MONO in NC group; B: correlation between levels of WBC and MONO in DM group; C: correlation between levels of WBC and LYMPH in NC group; D: correlation between levels of WBC and LYMPH in DM group.

WBC: white blood cell; MONO: monocyte; LYMPH: lymphocyte.

总 PBMC (tPBMC) 和不含 CD14⁺ 细胞的 PBMC [PBMC(exCD14⁺)] 中 PEDF 的表达差异, 发现单核细胞是 PBMC 中分泌 PEDF 的主要细胞, 这为进一步阐述单核/巨噬细胞及 PEDF 在 DR 发生发展中的作用提供了依据。

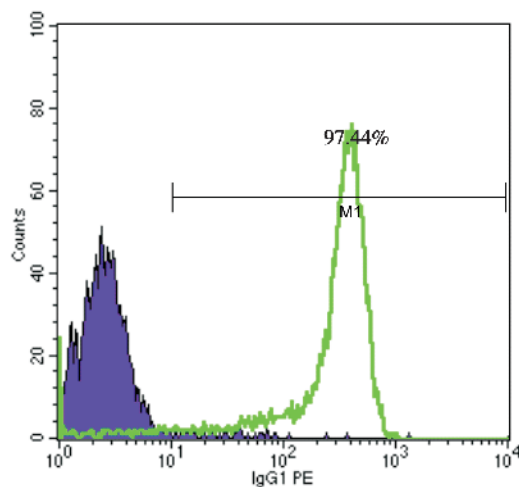


图 2 CD14⁺ 细胞纯度
Fig.2 Purity of CD14⁺ cell

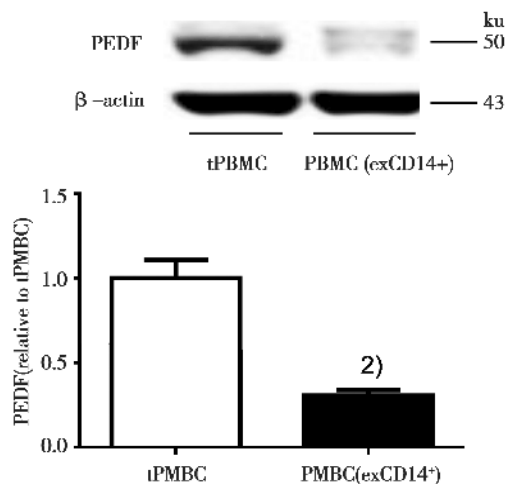


图 3 tPBMC 和 PBMC(exCD14⁺) 中 PEDF 蛋白表达水平
Fig.3 Protein level of PEDF in tPBMC and PBMC excluding CD14 positive cells

A: protein level of PEDF in PBMC and PBMC excluding CD14 positive cells; B: quantification of A.

PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PBMC(exCD14⁺): peripheral blood mononuclear cells excluding CD14 positive cells; 1) $P < 0.01$ vs PBMC group; 2) $P < 0.01$ vs PBMC group

PEDF 是一种由 418 个氨基酸构成的多功能分泌性糖蛋白, 分子量约 50 ku, 具有 3 个 β 折叠和 10 个 α 螺旋的典型结构, 属于丝氨酸蛋白酶抑

制剂超家族成员, 但其活性反应中心环结构并不具有抑制剂活性^[9]。除视网膜外, 眼其他部位如脉络膜、玻璃体、房水, 以及全身其他多个器官如肝、肾、胃、结肠、骨、脑、前列腺、睾丸、卵巢等组织均亦表达 PEDF^[10]。我们前期的研究首次观察到 2 型糖尿病患者总 PBMC 可表达 PEDF, 并且在 DR 患者明显升高, 提示 PBMC 可能通过产生 PEDF 影响 DR 发生发展^[5]。Valentina Marchetti 等^[4]向氧诱导的缺血性视网膜病变小鼠——一种 DR 动物模型玻璃体内注射 CD14⁺ 细胞后, 发现 CD14⁺ 细胞可通过改善炎症, 稳定缺血受损的视网膜血管结构, 降低血管闭塞程度, 减轻氧化应激和凋亡, 促进组织修复。提示单核/巨噬细胞可能改善糖尿病视网膜病变, 但其机制尚需进一步深入研究。目前观点认为^[11-12], 巨噬细胞可根据周围环境变化, 分化为作用不同的两群: M1 型和 M2 型。M1 型为经典的巨噬细胞, 激活后可增加炎症反应因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和氧自由基的产生, 参与慢性炎症进程^[12-15]; 而 M2 型激活可增加抗炎因子如白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)的产生, 具有修复损伤的能力^[12-15]。血管中单核细胞也有不同的亚型, 并且决定巨噬细胞的分型, 小鼠 Gr1⁺/Ly126^{high} 的单核细胞分化为 M1 型巨噬细胞, Gr1⁺/Ly126^{low} 的单核细胞分化为 M2 型巨噬细胞^[16]。G Fadini 等研究^[17]发现, M2 型巨噬细胞较 M1 型巨噬细胞产生更少的 TNF- α , 具有更低的穿越内皮的能力。DR 发生时, 进入视网膜局部的 M2 型巨噬细胞数量较少, 增加视网膜局部的 M2 型巨噬细胞数量可有效减少视网膜血管闭塞及新生血管形成, M2 型巨噬细胞的数量可影响糖尿病微血管并发症的发生发展。本研究观察到 DR 患者外周血单核细胞数量增加, 而 PBMC 中 PEDF 主要由 CD14⁺ 细胞即单核细胞表达, 单核细胞与组织中的巨噬细胞是同一类细胞在不同组织的不同名称, 其分子表面标记物均为 CD14。前期大量研究结果提示 PEDF 通过抗炎^[18]、抗血管增生^[19]、抗氧化应激^[10]等作用影响 DR 发生发展。因此我们推测, CD14⁺ 细胞中 M2 型巨噬细胞减轻 DR 程度的其中一个环节可能是通过 PEDF 释放增多。M1、M2 型巨噬细胞 PEDF 表达量可能存在差异, 在视网膜局部血流障碍时, 能及时到达效应部位的 M2 型巨噬细胞数量减少, 视网膜内 PEDF 的消耗持续增

多,因此出现 DR 时局部 PEDF 下降,而外周 PEDF 升高的情况。本研究的局限性是只观察到 CD14⁺ 细胞可表达 PEDF,若要证明以上推测,尚需对 M1 及 M2 型巨噬细胞中 PEDF 表达量进行比较以及进行下一步深入的研究。若证实 M2 型巨噬细胞在 DR 发生过程中具缓解作用,如何诱导单核/巨噬细胞分化为 M2 型细胞将是治疗 DR 可行的手段。

参考文献:

- [1] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy [J]. *Lancet*, 2010, 376(9735): 124-136.
- [2] Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy [J]. *Exp Diabetes Res*, 2007, 95103: 1-14.
- [3] Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker [J]. *Immunol Today*, 1993, 14(3): 121-125.
- [4] Marchetti V, Yanes O, Aguilar E, et al. Differential macrophage polarization promotes tissue remodeling and repair in a model of ischemic retinopathy [J]. *Sci Repo*, 2011, 1-12.
- [5] 吕秋菊,唐喜香,丘雅维,等. 2 型糖尿病视网膜病变患者外周血单个核细胞中 PEDF 与 TNF- α 水平的变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(2): 308-312.
- Lv QJ, Tang XX, Qiu YW, et al. Levels of PEDF and TNF- α in PBMC of type 2 diabetic retinopathy patients [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2014, 30(2): 308-312.
- [6] 颜虹. 医学统计学 [M]. 第 2 版,北京,人民卫生出版社, 2010: 204-206.
- Yan H. *Medical Statistics* [M]. The 2th edition, Beijing, People's medical publishing house, 2010: 204-206.
- [7] Chung FM, Tsai JC, Chang DM, et al. Peripheral total and differential leukocyte count in diabetic nephropathy: the relationship of plasma leptin to leukocytosis [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28(7): 1710-1717.
- [8] Moradi S, Kerman SR, Rohani F, et al. Association between diabetes complications and leukocyte counts in Iranian patients [J]. *J Inflamm Res*, 2012, 5(缺): 7-11.
- [9] Tombran-Tink J, Johnson LV. Collagen-induced alterations in intercellular adhesion and antigen expression in retinoblastoma cells [J]. *Exp Eye Res*, 1989, 48(4): 549-559.
- [10] Filleur S, Nelius T, De Riese W, et al. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(5): 769-775.
- [11] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease [J]. *Cell metabolism*, 2011, 13(1): 11-22.
- [12] Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage Plasticity and Polarization in Liver Homeostasis and Pathology [J]. *Hepatology*. 2014, 59(5): 2034-2042.
- [13] Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair [J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 93(6): 875-881.
- [14] Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling [J]. *Pathol*, 2013, 229(2): 176-185.
- [15] Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2012, 1(1): 10-16.
- [16] Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(2): 77-86.
- [17] Fadini G, De Kreutzenberg SV, Boscaro E, et al. An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(8): 1856-1866.
- [18] 赵一,周银莉,夏旋,等. 胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏色素上皮衍生因子表达的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2011, 32(4): 437-441.
- Zhao Y, Zhou YL, Xia X, et al. Effects of insulin therapy on pigment epithelium-derived factor PEDF expression in liver of diabetic rats [J]. *Journal of Sun Yat-Sen University (medical sciences)*, 2011, 32(4): 437-441, 462.
- [19] Park K, Jin J, Hu Y, et al. Overexpression of pigment epithelium-derived factor inhibits retinal inflammation and neovascularization [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(2): 688-698.

(编辑 孙慧兰)