

年龄相关黄斑变性亚临床炎症机制的研究现状

刘绚丽, 李平华

作者单位: (400016) 中国重庆市, 重庆医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 刘绚丽, 重庆医科大学在读眼科硕士研究生。

通讯作者: 李平华, 毕业于重庆医科大学, 主任医师, 副主任, 研究方向: 白内障、青光眼、屈光手术。CyliPinghua@163.com

收稿日期: 2013-11-03 修回日期: 2014-01-26

Current research status of the mechanism of age-related macular degeneration parainflammation

Xuan-Li Liu, Ping-Hua Li

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Ping-Hua Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. CyliPinghua@163.com

Received: 2013-11-03 Accepted: 2014-01-26

Abstract

• Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial - and polygenic - mediated chronic degenerative disease. Parainflammation is defined as a condition of tissue adaptive response to noxious stress or malfunction, it has features which are considered as intermediate between normal/basal and inflammatory/acute states. With the genetic predispositions, increased reactive oxygen species (ROS) generation cause the complement activation, placing the neuroretina-pigment epithelium-Bruch's membrane-choriocapillaris (NR-RPE-MB-CC) in the chronic condition of parainflammation which mediate apoptosis and angiogenesis, leading to AMD.

• **KEYWORDS:** AMD; parainflammation; complement; gene; ROS

Citation: Liu XL, Li PH. Current research status of the mechanism of age-related macular degeneration parainflammation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):451-453

摘要

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是一个多因素多基因多过程介导的慢性退行性疾病。亚临床炎症是组织结构对损害性应激或者异常功能做出的介于炎症和正常之间的状态, 其生理功能是保存正常功能和稳态。本文旨在通过亚临床炎症为中心, 探讨 AMD 各种致病机制的内在联系。在个体遗传基因不同易感性基础上, 危险因素直接或者间接通过氧自由基累积影响基因, 导致视网膜神经节-色素表皮细胞-Bruch 膜-

脉络膜毛细血管 (neuroretina-pigment epithelium-Bruch's membrane-choriocapillaris, NR-RPE-MB-CC) 长期处于一种亚临床炎症状态, 最终导致视网膜细胞凋亡或者脉络膜血管增生。

关键词: 年龄相关性黄斑变性; 亚临床炎症; 补体系统; 基因; 氧自由基

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.18

引用: 刘绚丽, 李平华. 年龄相关黄斑变性亚临床炎症机制的研究现状. *国际眼科杂志* 2014;14(3):451-453

0 引言

老年黄斑变性是累及视网膜神经上皮-色素上皮层-Bruch 膜-脉络膜毛细血管层的退行性变性、增生或萎缩的病变。老年性黄斑变性的机制研究有很多各种危险因素、遗传基因、表观遗传、氧化应激、炎症反应, 每一种机制都证明了和年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 的发生和进展很高的相关性, 可以确定 AMD 是一个多因素多基因多过程介导的慢性退行性疾病。根据目前研究, 有学者提出黄斑变性是长期受亚临床炎症刺激导致以上结构变性、功能损伤。所谓亚临床炎症是指长期暴露于有害环境或者处于功能异常的状况下, 组织产生固有免疫系统反应, 产生介于正常和炎症期中间的一种应激状态。根据此理论可将黄斑变性分为 3 期, 早期亚临床炎症期, 中期玻璃体疣/RPE 萎缩/色素变性, 进展期地图样萎缩或血管增生^[1]。

1 AMD 不是一般炎症

长期以来, AMD 都不被认为是炎症反应, 但大量 AMD 和炎症相关的现象被发现^[2,3]。在 AMD 患者的脉络膜组织中, 有活性免疫细胞如巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞。Bruch 膜变性表现为基底部薄片状的沉积物、玻璃体疣引起的膜增厚和各种炎症细胞浸润。视网膜被认为是免疫赦免的组织, 血液中的免疫系统不会接触到视网膜组织, 但是视网膜组织本身具有自己的免疫系统; 免疫趋化细胞如小胶质细胞和树突细胞和围绕在毛细血管周围的巨噬细胞, RPE 本身就具有一系列免疫功能。玻璃体疣的组织学分析提示免疫活性物质: 淀粉状蛋白 P、载脂蛋白 E、补体元件 C5, 和 C5b-9 膜攻击复合物 (MAC), 玻璃体粘连蛋白, 膜辅助蛋白 (MCP)^[4]。

AMD 的炎症现象不同于典型的急慢性炎症反应。有研究分析具有抗血管作用的糖皮质激素在 AMD 中的作用, 3 个临床研究分别是: 不同剂量的乙酸阿奈可他 (anecortave acetate) 和安慰剂, 曲安奈德 (triamcinolone acetonide, TA) 和安慰剂, 乙酸阿奈可他和 PDT, 观察 12mo 视力下降 3 行及以上的病例数。对比安慰剂 3mg 乙酸阿奈可他 RR=0.8 (95% CI=0.45~1.45); 30mg 乙酸阿奈可他 RR=0.45 (95% CI=0.21~0.97); 曲安奈德 RR=0.97 (95% CI=0.74~1.26); 乙酸阿奈可他对比 PDT, RR=

1.08(95% CI=0.91~1.29)^[5]。根据以上结果,具有抗血管作用的糖皮质激素在AMD治疗没有显著作用。糖皮质激素抑制靶酶减少白三烯类、前列腺素炎症介质生产,抑制炎症细胞因子表达增加抗炎介质表达,诱导炎症细胞凋亡,对体液和细胞免疫系统抑制,而在抑制氧自由基毒性和补体系统激活方便作用其微。激素的抗炎作用在AMD中很有限,证明此炎症不同于一般的急慢性炎症。

2 AMD是亚临床炎症

亚临床炎症有免疫细胞、细胞因子及补体参与,是组织结构对损害性应激或者异常功能做出的介于炎症和正常之间的状态,其生理功能是保存正常功能和稳态。在视网膜膜里,氧化脂质蛋白和自由基激活补体系统,并导致炎症因子增加是AMD亚临床炎症的主要病理生理过程。

补体激活物、细胞因子、趋化因子是亚临床炎症状态的主要表现。一项研究各种可疑危险因素与黄斑变性的发病率,结果显示高水平C3a,Bb,C5a,AMD发生率明显增高^[6],补体激活物是AMD的发生率很高的危险因素。另有研究在AMD患者眼中发现趋化因子CXCL11,蝥蛇毒素,RSAD2的mRNA分子水平被上调,通过信号通路NF- κ B和JAK-STAT在炎症应答的启动方面起了重要的作用,特别是CXCL11和免疫应答、玻璃体疣有密切联系^[7]。

AMD的亚临床炎症变为在视网膜神经层表现为小胶质细胞激活和视网膜下浸润及血-视网膜屏障破坏;在视网膜和脉络膜交界处表现为在Bruch膜上补体激活和视网膜下小胶质细胞的聚集;脉络膜的变化:(1)脉络膜增厚;(2)CD45(+)CRIg(+)型巨噬细胞增加;(3)脉络膜色素细胞形态的异常;(4)脉络膜组织纤维化^[8]。应用悬浮点阵技术分析各种细胞因子和生长因子的蛋白水平提示:抗炎因子IL10,IL1ra,IL9表达增加;促炎症因子IL4,IL15,IFN- γ ,而其他炎症因子IL8,MCP1,IP10表达下降^[9]。C3a,C5a,及C5b-9明显增高^[10],巨噬细胞适应性转变由促炎症型M1到抗炎症型M2^[11]。

3 基因与亚临床炎症

微阵列分析解释在AMD患者中大量炎症基因表达上调,研究发现至少有18~41种基因对AMD有影响。目前比较确切的和AMD发病及进展相关的基因是CFH基因及ARMS2/HTRA1基因^[12,13]。

ARMS2(rs10490924;A69S)与HTRA1基因(rs1120638,启动子多态性)位于染色体10q26,和补体系统有着直接或者间接联系,与AMD发展密切相关。CFH及相关基因CFHR1~CFHR5位于染色体1q31。CHF是补体系统的调控蛋白,主要作用是促成蛋白异/同二聚体形成,抑制补体分子C3活化。CFHR基因变异将导致病态的蛋白二聚体或者影响蛋白的识别区域导致功能丧失^[14],因此补体因子H(CFH)基因的多态性位点和AMD发病及进展密切相关。其中CFH-Y402H遗传型患AMD具有很高的风险。研究发现当纯合子的CFH-Y402H遗传型合并高水平的血液CRP浓度,将导致很高的AMD发生率和进展速度^[15]。同时异常的CHF导致补体活化分子增多^[16],长期的亚临床炎症刺激促进了AMD的发生和进展。

ARMS2(rs10490924;A69S)位于染色体10q26,与AMD密切相关。(1)在AMD患者中,ARMS2A69S和另一只眼的地图样萎缩变性和脉络膜新生血管有很强的联系性,甚至可以把ARMS2A69S当作是双眼AMD的标识信

号^[17]。(2)在含有CFH危险基因型AMD中,补体活化分子明显升高^[16]:C3d($P<0.0001$),C5a($P<0.0001$),CFB($P<0.0001$)C3d/C3比值升高($P<0.0001$)。ARMS2的变异体R38X对AMD有一定保护作用^[18]。(3)在不含有CFH危险基因型但含有ARMS2危险基因型的AMD中,也显示出高水平的补体活化。推测CFH和ARMS2可能有共同的AMD治病途径^[19,20]。

HTRA1(rs1120638,启动子多态性)也位于染色体10q26。在HTRA1的丝氨酸蛋白酶底物分析中发现有很多补体活化分子(凝集素、玻璃粘连蛋白、纤维调节素)和淀粉状蛋白沉积物(凝集素、 α 2-巨球蛋白、ADAM9);同时发现在AMD高致病等位基因HTRA1纯合子RPE细胞培养中,HTRA1 mRNA的表达量是野生型等位基因RPE细胞培养中的3倍。这些提示HTRA1致AMD途径中和补体系统密切相关^[21]。还发现其他和补体基因被证明和AMD密切相关,包括:CFB,C2,C3,CFI,TIMP3,LIPC。

4 氧自由基启动亚临床炎症

NR-RPE-MB-CC由于其生理解剖特性长期处于高自由基氧化和高代谢状态。首先视网膜神经上皮起源于神经内胚层,是不可再生细胞。其次AMD患者的脉络膜血管萎缩及纤维化,血流减少不稳定,氧自由基更易累积;膜盘含有高浓度的自由基和光损伤后的蛋白及脂类,RPE吞噬膜盘中会产生ROS,可残留些膜组织参与脂褐素的形成。膜盘的吞噬过程产生的光损害、ROS、脂褐素对RPE膜是很强的氧化负担,也容易波及周围组织。最后外界因素比如衰老吸烟等可以减弱抗氧化能力或者增加ROS的产生。当氧化及抗氧化系统失衡,高活性分子氧自由基(ROS)及氮自由基产生增多,将启动一系列基因,导致补体激活和细胞因子产生,使视网膜长期处于亚临床炎症状态。

氧化脂质蛋白和自由基是主要的激发亚临床炎症的因素。视网膜外层RPE和光感细胞中有很丰富的最易被氧化的脂肪酸——碳六烯酸,而视网膜外层的高氧和光环境也有利于其氧化,产生碳六烯酸氧化物的加合物carboxyethylpyrrole(CEP)。研究发现,对比对照组,AMD患者的视网膜外层有更多CEP修饰蛋白,血浆中有更多CEP的抗体。实验用含CEP小鼠血清白蛋白(CEP-MSA),对照组用鼠血清白蛋白免疫小鼠,10d后发现实验组CEP抗体滴度是对照组的6~8倍。2~3mo后,组织学发现CEP-MSA组中RPE有囊泡样和水肿改变,细胞溶解,同时有单核细胞浸润到感光细胞基质层中;在Bruch膜上和溶解细胞中发现C3d(C3d是C3,C5转化酶的重要因子),提示补体系统参与细胞溶解;巨噬细胞因为趋化因子在RPE损伤附近浸润^[10]。这证明了氧化自由基激活补体,致视网膜亚临床炎症。

5 自由基致不同AMD的类型

氧自由基毒性作用可以致细胞凋亡或者新生血管形成,导致干性和湿性黄斑变性。

5.1 自由基致凋亡途径 氧自由基启动补体相关基因导致细胞凋亡。(1)一项研究^[11]发现HTRA1的SNP多样性和AMD的发生密切相关。在H2O2诱导的鼠胚胎成纤维细胞和ARPE-19细胞早熟过程中HTRA1相关蛋白和mRNA显著增高。(2)同时发现p21(CIP1/WAF1),p16(INK4a),SA- β -半乳糖苷酶这三种早衰的相关标志物在HtrA1+/-MEFs中明显高于HtrA1-/-MEFs。细胞衰老过

程是通过 p38 MAPK 信号通路介导的,在 Htra1 +/-MEFs 中氧化应激激发 p38 MAPK 通路明显快于 Htra1 -/-MEFs,且用 P38 通路的抑制剂能阻止由 HTRA1 诱导的细胞衰老。(3)研究发现 JNK1(属于 MAPK 家族)缺失的鼠炎症更轻,CNV 和 VEGF 也少;注入 JNK1 的阻滞剂可以减少细胞凋亡和 CNV^[22]。氧化应激引起的细胞凋亡还有其他的途径,这些途径都和亚炎症状态密切相关^[23,24]。

5.2 自由基致新生血管途径 氧自由基激活相关基因导致 VEGF 大量产生和其他炎症细胞和因子如 FGF,TGF,TNF,ILs、补体导致脉络膜血管侵袭入视网膜,形成亚临床炎症和脉络膜新生血管。

氧自由基激活沉默基因 SIRT1(在分子损伤或者氧化应激状态下应答依赖 NAD⁺的第 3 类组蛋白去乙酰化酶,可以调节基因沉默,细胞分化和凋亡)。SIRT1 传信号导致 HIF-2 α 累积激活,HIF-2 α 被激活后释放大量的 VEGF^[25]。

自由基在不同的基因型的患者中导致不同程度的脉络膜的新生血管。一项研究证实^[26]由于视网膜强光暴露,氧化磷脂(oxPLs)在眼内累积,oxPLs 在 AMD 患者眼中明显高于非 AMD。oxPLs 启动巨噬细胞浸润,并同 ERP、巨噬细胞结合后,将启动炎症因子瀑布流,导致亚临床炎症和脉络膜新生血管。不同基因型的 CFH 同 oxPLs 的结合力不同,保护型 CFH 402Y rs1061170 基因型同 oxPLs 有更高的结合力,能阻止 oxPLs 同 ERP、巨噬细胞结合。很多其他研究表明不同的基因型可导致不同程度的脉络膜的新生血管;而不同基因型的患者对抗 VEGF 的疗效不同^[27]。

AMD 是一个多因素多基因多过程介导的慢性退行性病变。遗传基因导致个体 AMD 易感性不同,随着年龄增长各种环境危险因素及解剖结构生理特性导致氧自由基增多,氧自由基影响相关基因导致补体激活和各种炎症因子大量产生使 NR-RPE-MB-CC 长期处于一种亚临床炎症状态,通过相关基因或者直接诱导信号通路,致细胞凋亡或者新生血管形成。

参考文献

- 1 Parmeggiani F, Romano MR, Costagliola C, et al. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm* 2013;2013:435607
- 2 Grossniklaus HE, Martinez JA, Brown VB, et al. Immunohistochemical and histochemical properties of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1992;114(4):464-472
- 3 Lopez PF, Grossniklaus HE, Brown VB, et al. Pathologic features of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1991;112(6):647-656
- 4 Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, et al. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J* 2005;19(12):1683-1685
- 5 Geltzer I A, Turalba A, Vedula SS. Surgical implantation of steroids with antiangiogenic characteristics for treating neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;1:CD005022
- 6 Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, et al. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(12):5818-5827
- 7 Lin T, Walker GB, Kurji K, et al. Parainflammation associated with advanced glycation endproduct stimulation of RPE *in vitro*: implications for age-related degenerative diseases of the eye. *Cytokine* 2013;62(3):

369-381

- 8 Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res* 2009;28(5):348-368
- 9 Kao CL, Chen LK, Chang YL, et al. Resveratrol protects human endothelium from H(2)O(2)-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation. *J Atheroscler Thromb* 2010;17(9):970-979
- 10 Hollyfield JC, Bonilha VL, Rayborn ME, et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med* 2008;14(2):194-198
- 11 Ardeljan D, Chan CC. Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog Retin Eye Res* 2013;37:68-89
- 12 Cruz-González F, Cieza-Borrella C, López Valverde G, et al. CFH (rs1410996), HTRA1 (rs112000638) and ARMS2 (rs10490923) gene polymorphisms are associated with AMD risk in Spanish patients. *Ophthalmic Genet* 2013 Mar 27. Epub ahead of print
- 13 Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, et al. Association analysis of CFH and ARMS2 gene polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* 2013;50(2):117-122
- 14 Skerka C, Chen Q, Fremaux-Bacchi V, et al. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol* 2013;56(3):170-180
- 15 Robman L, Baird PN, Dimitrov PN, et al. C-reactive protein levels and complement factor H polymorphism interaction in age-related macular degeneration and its progression. *Ophthalmology* 2010;117(10):1982-1988
- 16 Smailhodzic D, Klaver CC, Klevering BJ, et al. Risk alleles in CFH and ARMS2 are independently associated with systemic complement activation in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012;119(2):339-346
- 17 Schwartz SG, Agarwal A, Kovach JL, et al. The ARMS2 A69S variant and bilateral advanced age-related macular degeneration. *Retina* 2012;32(8):1486-1491
- 18 Teper SJ, Nowińska A, Wylegata E, et al. A69S and R38X ARMS2 and Y402H CFH gene polymorphisms as risk factors for neovascular age-related macular degeneration in Poland - a brief report. *Med Sci Monit* 2012;18(2):PR1-3
- 19 Yanagisawa S, Kondo N, Miki A, et al. A common complement C3 variant is associated with protection against wet age-related macular degeneration in a Japanese population. *PLoS One* 2011;6(12):e28847
- 20 Kim YH, Kim HS, Mok JW, et al. Gene-gene interactions of CFH and LOC387715/ARMS2 with Korean exudative age-related macular degeneration patients. *Ophthalmic Genet* 2013;34(3):151-159
- 21 An E, Sen S, Park SK, et al. Identification of novel substrates for the serine protease HTRA1 in the human RPE secretome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(7):3379-3386
- 22 Du H, Sun X, Guma M, et al. JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(6):2377-2382
- 23 Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, et al. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2002;120(11):1435-1442
- 24 Takahashi A, Masuda A, Sun M, et al. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull* 2004;62(6):497-504
- 25 Balaiya S, Khetpal V, Chalam KV. Hypoxia initiates sirtuin1-mediated vascular endothelial growth factor activation in choroidal endothelial cells through hypoxia inducible factor-2 α . *Mol Vis* 2012;18:114-120
- 26 Shaw PX, Zhang L, Zhang M, et al. Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(34):13757-13762
- 27 McKibbin M, Ali M, Bansal S, et al. CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2012;96(2):208-212