

TLR3 与年龄相关性黄斑变性疾病的相关性

熊金巧, 彭 惠

作者单位:(400016)中国重庆市,重庆医科大学附属第一医院眼科 重庆市眼科研究所

作者简介:熊金巧,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:彭惠,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病。Pengh9@yahoo.com.cn

收稿日期:2013-12-04 修回日期:2014-02-10

Correlation between TLR3 and age-related macular degeneration

Jin-Qiao Xiong, Hui Peng

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

Correspondence to: Hui Peng. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Eye Institute, Chongqing 400016, China. Pengh9@yahoo.com.cn
Received:2013-12-04 Accepted:2014-02-10

Abstract

• Age-related macular degeneration, also called ARMD, is a chronic progressive disease that occurs mostly in people over the age of 50, which is the main blinding eye disease in the elderly in developed countries, also the main cause of irreversible visual impairment in developing countries. The ARMD includes geographic atrophy and choroid neovascularization. While its specific etiology and pathogenesis unclear, most scholars believe that ARMD is a multifactor disease. The relationship between Toll-like receptor 3 (TLR3) and ARMD becomes the study hotspot, this paper summarize the research progress of this spot.

• **KEYWORDS:** age-related macular degeneration; Toll-like receptor 3; SNP

Citation: Xiong JQ, Peng H. Correlation between TLR3 and age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):454-456

摘要

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)是一种多发于50岁以上人群的慢性进展性疾病,是发达国家老年人群的主要致盲性眼病,也是发展中国家老年人群不可逆视力损害的主要原因,ARMD包括地图状萎缩及脉络膜新生血管两类。由于其具体病因和发病机制尚不明确,大多数学者认为这是一种多因素疾病。近年来Toll样受体3(Toll-like receptor 3, TLR3)与ARMD关系的研究成为热点,本文就近年来相关研究进展做一综述。

关键词: 年龄相关性黄斑变性; Toll样受体3; 单核苷酸多态性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.19

引用: 熊金巧,彭惠. TLR3与年龄相关性黄斑变性疾病的相关性. 国际眼科杂志 2014;14(3):454-456

0 引言

近年来,全世界范围中老年人年龄相关性黄斑变性患者发病率逐年增加,在发达国家,年龄相关性黄斑变性为不可逆性视力减退的最常见原因;中国已经进入老龄化社会,老年人视力问题尤其是年龄相关性眼病逐渐成为社会关注的热点,既往多项研究表明年龄与黄斑变性有明确关联性^[1-3];随着分子生物学技术的进展,更多的基因学相关研究陆续面世,对Toll样受体相关研究成为热点,它广泛存在于哺乳动物体内,与机体内多种信号传导有密切关系,且Toll样受体与年龄相关性黄斑病变相关性的研究也逐渐增多,了解近年来Toll样受体与ARMD相关性有便于更能系统的了解目前研究现状,也为将来有效防盲致盲提供依据。

1 年龄相关性黄斑变性

ARMD以黄斑区光感受器、视网膜色素上皮、Bruch膜和脉络膜毛细血管的慢性进行性变性为特征,是发达国家首要的致盲眼病,其病因及发病机制尚不清楚。ARMD分为萎缩型和渗出型两类,萎缩型(又称为“干性”)ARMD,主要为脉络膜毛细血管萎缩、Bruch膜增厚和视网膜色素上皮(RPE)萎缩等引起的黄斑区萎缩变性;渗出型(又称为“湿性”)ARMD,主要为Bruch膜破坏、视网膜下新生血管形成,发生黄斑区视网膜色素上皮或神经上皮浆液性或出血性盘状脱离,或者两者同时存在,最终成为机化瘢痕。目前认为ARMD是多因素引起的疾病,可能同氧化损伤、微血管疾病和遗传等因素有关,高龄、吸烟、高血压、饮食、慢性光损伤等在ARMD的发生发展中起重要作用。

随年龄增长人眼视网膜光感受器层细胞数目逐渐减少,表现为黑色素减少,脂褐素沉积^[1]。卢艳等^[2]曾发现视网膜神经节细胞层细胞数目与小鼠的月龄有相关性($r = -0.673, P < 0.05$)。Sundelin等^[3]通过研究证实光辐射会造成RPE细胞和光感受细胞的损伤。目前ARMD治疗方法有光凝疗法、小剂量放射疗法、光动力疗法、瞳孔温热疗法、手术治疗及药物治疗等^[4]。

2 Toll样受体

Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)是新近发现的存在于哺乳动物细胞表面并广泛表达于天然免疫系统,在天然免疫中发挥重要作用的一种细胞跨膜蛋白受体,是病原模式识别受体之一,并被视为联系天然免疫和获得性免疫的桥梁^[5]。

1988年,Hashimoto等在果蝇中发现鉴定了这个家族的第一个成员——Toll样蛋白。继之,1996年,Lemaitre等首先指出Toll样蛋白具有抗真菌感染的作用,并发现Toll突变的成虫果蝇极易感染真菌,1a后Medzhitov等在哺乳动物中发现了第一个果蝇Toll的同源物(现命名为

TLR4),且它能诱导炎症应答基因的表达。之后,在哺乳动物中 Toll 受体的同源物相继被发现,构成 Toll 样受体(TLRs)家族^[6]。迄今为止,在动物中已经发现 15 种 TLRs^[7](在人体已经发现 11 个成员,即 TLR1~TLR10 和 TLR14,小鼠不表达 TLR10,但发现了 TLR11~13^[8],在鸡中发现了 TLR15^[9])。其中 TLR3,TLR4,TLR7,TLR8,TLR9 与病毒感染性疾病如生殖器疱疹、尖锐湿疣、艾滋病等有着极为密切的关系^[10]。

TLRs 因识别的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns,PAMP)不同,在细胞中分布也不相同。TLR1,TLR2,TLR4,TLR6 分布于细胞表面,能聚集到接触微生物的吞噬体上;TLR3,TLR7,TLR8,TLR9 则定位在细胞内,用于识别核酸,如 TLR3 识别病毒 dsRNA 及多聚糖,TLR9 则识别未甲基化的 DNA CpG(胞嘧啶磷酸鸟苷)基序^[11]。

3 ARMD 与 TLR3 的相关性

随着现代生物化学技术的发展,目前在外周血中定量检测 TLRs 已不再是难事,今年 Zhu 等^[12]通过对 25 例湿性 ARMD 患者及 25 例年龄匹配的健康人的对照研究发现湿性 ARMD 患者的外周单个核细胞(PBMCs)中 TLR2 和 TLR3 mRNA 和蛋白的表达显著高于对照组,而在 TLR1,TLR4~TLR10 mRNA 的表达中这种差异两组之间并不显著。且湿性 ARMD 患者的 PBMCs 比非 ARMD 者能产生更多针对 TLR2 配体(肽聚糖)的 IL-6 与 IL-8 蛋白质和针对 TLR3 配体(多聚糖)的 IL-6,并得出 TLR2 和 TLR3 可能与湿性 ARMD 的发病机制有关的结论。2012 年,Kleinman 等^[13]通过研究表明,短干扰 RNA 激活 TLR3,TLR3 激活物通过干扰素调节因子(interferon regulatory factor,IRF3)引起的核移位促发半胱天冬酶-3 介导的 RPE 细胞凋亡,得出短干扰 RNA 通过 TLR3 及 IRF3 等诱导视网膜变性的结论。更有 Fujimoto 等^[14]学者研究表明,肺炎支原体性肺炎患者通过 RPE 的 TLR2 的表达而增加脉络膜新生血管的发生。Zarepari 等^[15]进行相关研究,得出结论:TLR4 的变异体 D299G 与 ARMD 的敏感性有关,然而,Despriet 等^[16]研究表明没有足够证据证明 TLR4 与 AMD 的发病有关系。目前多项研究表明,ARMD 疾病的发生与 TLR3 的相关性相对于其他 TLRs 更为显著。

3.1 ARMD 与 TLR3 的相关性 TLRs 在人体内发挥着重要作用,可识别多种病原模式,其中 TLR3 主要识别病毒性双链 RNA,编码 TLR3 的基因位于第 4 号染色体 q35 区,包含 5 个外显子和 4 个内含子。SNP(单核苷酸多态性)位点 Leu412Phe(rs3775291)是 TLR3 基因第 4 外显子的 C 转换成 T,导致编码的 412 位氨基酸由亮氨酸突变为苯丙氨酸。最近的一项研究表明该位点是干性 ARMD 患者的保护因素,但与湿性 ARMD 无明显相关^[7]。Zhou 等^[17]根据已有数据通过 Meta 分析指出 TLR3 C1234T 的 T 等位基因的概率为 0.753(95%可信区间:0.612~0.927;P=0.007),并指出 TLR3 中的这个等位基因 C1234T(蛋白质中的 L412F 变异体)也许能通过减少 TLR3 至 mRNA 的结合量从而减少地干性 ARMD 的发生。以上研究均提示 TLR3 与干性 ARMD 的发生有关。

然而,Maloney 等^[18]对 8 例有视网膜新生血管膜的患眼及 4 例不伴视网膜新生血管的健康眼的眼底血管膜进行 TLR3 免疫染色,研究发现所有具有视网膜新生血管眼中,RPE 细胞中均有 TLR3 表达,而在血管内皮细胞和成纤维细胞中无 TLR3 表达。对照的健康眼中视网膜锯齿缘附近 RPE 细胞染色强于后极部 RPE 细胞染色,其中有

3 例健康眼后极部没有被染色。这个研究发现健康眼与有视网膜新生血管眼的 RPE 细胞在 TLR3 表达上有特异性差异,且 TLR3 有可能是人类湿性 ARMD 的病变受体。

Patel 等^[19]曾指出 Toll 样受体在天然免疫系统中是必不可少的受体,它可以应激性抵御细菌和病毒的病原体,TLR3 失调可能有助于 ARMD 的发生,表明 TLR3 的精确调控在 ARMD 的治疗中有重要作用。有科学家指出,慢性炎症是导致许多老年性退行性神经疾病(包括黄斑变性)的一个重要的组件,2011 年,Shiose 等^[20]通过在老鼠的视网膜研究中证实:变性的视网膜产生的内源性物质刺激 TLR3 引起细胞凋亡、视网膜炎症及因为缺失 TLR3 而阻止小鼠的视锥视杆细胞的退化。虽然是动物实验,但也能从另一方面反应 TLR3 与人类视细胞的相关联系。目前公认 TLR3 与 ARMD 有联系,但具体作用途径尚不清楚。Wörnle 等^[21]曾为了阐明 TLR3 在 ARMD 疾病发病中的作用,同时也为了探讨 TLR3 介导的烷基磷酸胆碱(APCs)和生长因子在人视网膜色素上皮(RPE)细胞上的表达。用流式细胞培养及 RT-PCR 的方法进行试验并得出结论:在 RPE 细胞中促炎细胞因子和趋化因子的表达取决于 TLR3 的特异性。特异的 TLR3 和 APCs 的 siRNA(短干扰 RNA)可阻止下游基因的表达;因此,TLR3 可以考虑为治疗 ARMD 的新目标。

3.2 TLR3 基因多态性与 ARMD 相关性 随着眼科研究的进一步深入,TLR3 基因多态性与 ARMD 的相关性同样也成为各方学者们研究的热点。2009 年 Cho 等^[22]针对 AMD 患者的三个独立样本 NEI(the National Eye Institute Clinical Center)(n=320),AREDS(the Age-Related Eye Disease Study)(n=483)、BMES(the Blue Mountains Eye Study)(n=852)进行研究探讨 TLR3 的基因多态性 rs3775291 和 TLR4 的基因多态性 rs4986790 与 ARMD 之间的联系,但未发现明显阳性结果。次年,Sng 等^[23]通过对新加坡籍华人中 246 例渗出性 ARMD 患者(其中 126 例 CNV 即脉络膜新生血管,120 例 PCV 即息肉状脉络膜血管病变)与正常对照组的横断面研究,比较 CNV 及 PCV 患者的 TLR3 rs3775291 等位基因及其基因型频率,发现新加坡籍华人中 TLR3 rs3775291 的基因多态性与 CNV 及 PCV 发病无明显关联。为研究中国平原地区汉族人群中 TLR3 rs3775291 位点基因多态性与湿性 ARMD 的相关性,2010 年胡健艳等^[24]收集南通大学附属医院确诊的 109 例湿性 ARMD 患者(试验组)及该地区 150 例正常人(对照组),用 TaqMan-MGB 荧光探针法检测 TLR3 外显子 4 片段上 SNP 位点 Leu412Phe(rs3775291),比较两组人群等位基因及基因型的频率分布,发现中国平原地区汉族人群中 TLR3 基因的 SNP 位点 rs3775291 与湿性 ARMD 的发生无明显相关性。内源性 dsRNA 序列特异性基因沉默的发现推动了合成的短干扰 RNAs(siRNAs)向前沿的靶向药物工程的进展。在此背景下,Kleinman 等^[13]在小鼠模型上进行使用具有 21 个核苷酸的 siRNAs 治疗湿性 ARMD 的第一个临床试验,结果发现这些“裸”siRNAs 通过 RNAi(RNA interfere,RNA 干扰)及细胞表面 TLR3 协同作用抑制老鼠的新生血管的形成;同时也证实外源性 siRNAs 通过激活老鼠 RPE 细胞表面的 TLR3 而导致其视网膜变性的观点。胆固醇共轭的 siRNAs 能够进行细胞渗透和触发 RNAi,也能引起相同的表现。细胞基质内的 dsRNA 传感器并不是外源性 siRNAs 诱发黄斑变性的关键,TLR3 可触动干扰素-3 核移位的 RPE 的天冬氨酸蛋白水解酶 3 而介导细胞凋亡。

Yang等^[25]学者发现特殊的基因变异使 ARMD 患者病情向地图状萎缩发展的病理机制是未知的。他们检测功能性 TLR3 rs3775291 基因与欧美地区的 ADM 患者数量下降的关系,同时也检测 TLR3 上的亮氨酸与苯丙氨酸变异体对于体外 RPE 细胞的生存能力的影响和对于野生型老鼠 RPE 细胞及敲除 TLR3 的老鼠的 RPE 细胞的细胞凋亡的影响。结果发现苯丙氨酸 (Phe) 的多态性表达与地图性萎缩负相关 ($P=0.005$); TLR3 中具有亮-亮 (Leu-Leu) 基因型的 REP 细胞的凋亡速度远远超过亮-丙 (Leu-Phe) 基因型,而且野生型老鼠的 RPE 细胞的凋亡多于 TLR3 基因剔除的老鼠。因此 TLR3 412Phe 基因干预地图性萎缩性 AMD 发生的机制很可能是通过阻止 RPE 细胞凋亡。针对于多样性的 TLR3 基因 (表达信使 RNA 的 C1234T、蛋白质的 L412F 及介导 SNP 集群的 rs3775291) 与地图性萎缩性 ARMD (GA) 的基因相关性, Zhou 等^[17]对 TLR3 的 T 等位基因 C1234T 进行了 Meta 分析,显示总体优势比为 0.753 (95% 置信区间: 0.612 ~ 0.927; $P=0.007$)。并发现这个 SNP 并不影响 TLR3 的 mRNA、蛋白质或细胞表面物质表达。然而,在野生型小鼠中 TLR3 的突变基因 L412F 与双链 RNA 在 TLR3 的蛋白质中的结合力具有显著差异 51.12% ± 3.96% ($P < 0.001$), TLR3-介导的 NF- κ B 激活持续减少,因此,TLR3 的 C1234T 等位基因 (表达蛋白质的 L412F) 可能通过降低 TLR3 与 dsRNA 的结合能力来干预 GA 发生。

目前对于 TLRs 与眼部疾病的相关研究均表明 TLRs 尤其是 TLR3 与眼内疾病具有密切关系,且 TLR3 促进 ARMD 疾病的发生发展。TLR3 的 SNP 位点 Leu 基因变异至 412Phe 是干性 ARMD 患者的保护因素,但与湿性 ARMD 无明显相关^[7,24]; TLR3 可引起小鼠 RPE 细胞凋亡、视网膜炎症,敲除 TLR3 可阻止小鼠的感光细胞的退化^[21]; TLR3 的 C1234T 等位基因可能通过降低 TLR3 与 dsRNA 的结合能力来干预 GA^[19]。特异的 TLR3 和 APCs (烷基磷酸胆碱) 的 siRNA 阻止下游基因的表达从而阻止 RPE 细胞中促炎细胞因子和趋化因子的表达^[21]。2011 年 Chen 等^[26]对于白种人的一篇相关研究指出 CFH 基因与双眼地图状萎缩的关联性比双眼脉络膜新生血管性 ARMD 的关联性更强。目前 TLRs 与 CFH (Complement Factor H 补体因子 H) 之间是否有关联尚不清楚,所以, ARMD 表型、TLRs 及基因型间的关联性研究还需要更详尽地分析和更大样本量的支持。

4 展望

TLRs 的相关研究已经涉及医学研究的众多领域,并不断向纵深发展,目前 TLR 在眼部疾病中的机制还有许多待研究之处。相信随着 TLR 在眼部组织的表达以及免疫炎症反应研究的不断深入,将会为眼部感染性、免疫反应性眼病的发病机制及治疗相关研究推上一个新的世界舞台。

参考文献

- 李文娟,彭清华. 年龄相关性黄斑变性的病因学研究进展. 国际眼科杂志 2011;11(9):1558-1560
- 卢艳,赵可浩,李林,等. 增龄大鼠视网膜老化过程中各层细胞数目变化. 眼科新进展 2008;28(5):321-326
- Sundelin S, Wihlmark U, Nilsson SE, et al. Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity. *Curr Eye Res* 1998;17(8):851-857
- 陈光胜. 年龄相关性黄斑变性的治疗进展. 华夏医学 2008;21(2):402-405

- 白峰岩,李戈. 系统性红斑狼疮患者 Toll 样受体、核因子- κ B 水平研究进展. 实用医院临床杂志 2010;7(2):130-132
- 常晓彤,肇晓峰,王振辉. Toll 样受体信号转导途径研究进展. 生理科学进展 2011;42(5):340-346
- 韩正强,王楠楠. Toll 样受体的研究进展. 畜牧与兽医 2011;43(12):93-96
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376
- Higgs R, Cormican P, Cahalane S, et al. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following salmonella enterica serovar typh in urium infection. *Infect Immun* 2006;74(3):1692-1698
- 付金玲,李其林. Toll 样受体与病毒感染的研究现状. 中国皮肤性病学杂志 2009;23(1):57-58
- Zyzak J, Matuszyk J, Siedmienko J. Multilevel maturation of Toll-like receptor 9. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2013;67:1034-1046
- Zhu Y, Liang L, Qian D, et al. Increase in peripheral blood mononuclear cell Toll-like receptor 2/3 expression and reactivity to their ligands in a cohort of patients with wet age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2013;19:1826-1833
- Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, et al. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol Ther* 2012;20(1):101-108
- Fujimoto T, Sonoda KH, Hijioka K, et al. Choroidal neovascularization enhanced by Chlamydia pneumoniae via Toll-like Receptor 2 in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(9):4694-4702
- Zarepari S, Buraczynska M, Branham KE, et al. Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2005;14(11):1449-1455
- Despriet DD, Bergen AA, Merriam JE, et al. Comprehensive analysis of the candidate genes CCL2, CCR2, and TLR4 in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(1):364-371
- Zhou P, Fan L, Yu KD, et al. Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *FASEB J* 2011;25(10):3489-3495
- Maloney SC, Anteck E, Orellana ME, et al. Choroidal neovascular membranes express toll-like receptor3. *Ophthalmic Res* 2010;44(4):237-241
- Patel AK, Hackam AS. Toll-like receptor 3 (TLR3) protects retinal pigmented epithelium (RPE) cells from oxidative stress through a STAT3-dependent mechanism. *Mol Immunol* 2013;54(2):122-131
- Shiose S, Chen Y, Okano K, et al. Toll-like receptor 3 is required for development of retinopathy caused by impaired all-trans-retinal clearance in mice. *J Biol Chem* 2011;286(17):15543-15555
- Wörnle M, Merkle M, Wolf A, et al. Inhibition of TLR3-mediated proinflammatory effects by Alkylphosphocholines in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6536-6544
- Cho Y, Wang JJ, Chew EY, et al. Toll-like receptor polymorphisms and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(12):5614-5618
- Sng CC, Cackett PD, Yeo IY, et al. Toll-like receptor 3 polymorphism rs3775291 is not associated with choroidal neovascularization or polypoidal choroidal vasculopathy in Chinese subjects. *Ophthalmic Res* 2011;45(4):191-196
- 胡健艳,杨晓钊,管怀进,等. Toll 样受体 3 基因单核苷酸多态性与湿性年龄相关性黄斑变性的关联研究. 眼科新进展 2010;30(4):355-357
- Yang Z, Stratton C, Francis PJ, et al. Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2008;359(14):1456-1463
- Chen Y, Zeng J, Zhao C, et al. Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with genetic markers and environmental factors. *Arch Ophthalmol* 2011;129(3):344-351