

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.01.009

湿性年龄相关性黄斑变性患者外周血单个核细胞 Toll样受体 3 的表达及意义

祝 毅, 钱 丹, 钟沐睿, 彭 惠

(重庆医科大学附属第一医院眼科、重庆市眼科学重点实验室, 重庆 410006)

【摘要】目的:探索 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)3/4 在湿性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的表达及其意义。**方法:**25 例湿性 AMD 患者和 24 例正常对照纳入本研究。患者与正常对照组均不患有糖尿病、冠心病、高血压等慢性疾病或免疫性疾病及与免疫相关的疾病。采用 real-time PCR 的方法检测 TLR3/4 的基因水平的表达,流式细胞术检测 TLR3 蛋白水平的表达。TLR3 特定的配体 PolyI:C 刺激后,ELISA 检测白介素(interleukin, IL)-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)的表达。**结果:**在 PBMCs 水平,AMD 组 TLR3 在 mRNA 及蛋白水平表达均显著高于正常对照组,而 TLR4 的 mRNA 水平表达在 2 组之间无统计学差异。与对照组 PBMCs 相比,AMD 组 PBMCs IL-6 及 IL-8 的表达明显升高,TLR3 的配体 PolyI:C 刺激后,AMD 组 PBMCs IL-6 的表达显著增多,MCP-1、IL-8 的表达在 2 组之间无统计学差异。**结论:**TLR3 在 AMD 组表达上调,活化后可促进 IL-6 表达增多。由此推测 TLR3 信号通路可能通过促进促炎性细胞因子的表达在湿性 AMD 的发病发展中发挥着重要作用。

【关键词】年龄相关性黄斑变性;Toll 样受体;外周血单个核细胞;细胞因子;视网膜

【中图分类号】R774.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-05

作者简介:祝 毅,Email:389151094@qq.com,

研究方向:眼外伤、玻璃体视网膜疾病、眼底病。

通信作者:彭 惠,Email:pengh9@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局重点资助项目(编号:2012-1-026)。

patients with low-grade diffuse astrocytomas[J].Brain Pathol, 2003, 13(2):176-184.

[4] 饶雪峰,刘伟中,廖传文,等.MMP-7 在肝细胞癌组织中的表达及临床意义[J].世界华人消化杂志,2009,17(28):2903-2907.

[5] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1):60-69.

[6] Vielhauer V, Sarafoff M, Gais P, et al. Cell type-specific induction of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mRNA expression in rat liver during regeneration, inflammation and preneoplasia[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127(10):591-602.

[7] Ishikawa T, Zhang SS, Qin X, et al. DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models[J]. Cancer Sci, 2004, 95(2):112-117.

[8] Noda H, Mashima R, Kamiyama H, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in sporadic colorectal cancer in young patients[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26(4):521-526.

[9] Weaver KD, Grossman SA, Herman JG. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma [J]. Cancer Invest, 2006, 24(1):35-40.

[10] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents[J]. N Engl J Med, 2000, 343(19):1350-1354.

[11] Sun YH, Zhang YZ, Wang ZC, et al. Relationship between the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma and the survival time of patients[J]. Ai Zheng, 2004, 23(9):1052-1055.

[12] Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface[J]. Nature, 2001, 411(6835):375-379.

[13] Samukange V, Yasukawa K, Inouye K, et al. Interaction of 8-anilino-naphthalene 1-sulphonate(ANS) and human matrix metalloproteinase 7(MMP-7) as examined by MMP-7 activity and ANS fluorescence[J]. J Biochem, 2012, 151(5):533-540.

[14] Kivisaari AK, Kallajoki M, Mirtti T, et al. Transformation-specific matrix metalloproteinases(MMP)-7 and MMP-13 are expressed by tumour cells in epidermolysis bullosa-associated squamous cell carcinomas[J]. Br J Dermatol, 2008, 158(4):778-785.

[15] Varro A, Kenny S, Hemers E, et al. Increased gastric expression of MMP-7 in hypergastrinemia and significance for epithelial-mesenchymal signaling[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(4):G1133-1140.

[16] 冯俊伟,张志勇,刘爱东,等.结直肠癌中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达相关性研究[J].重庆医科大学学报,2012,37(3):205-208.

(责任编辑:冉明会)

Expression and significance of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with wet age-related macular degeneration

Zhu Yi, Qian Dan, Zhong Murui, Peng Hui

(Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether the toll-like receptors (TLRs) 3/4 are associated with wet form age-related macular degeneration (AMD). **Methods:** Blood samples were collected from 25 wet AMD patients and 24 age-matched healthy controls. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Expression of TLR3 and TLR4 mRNA was assessed by real-time PCR. TLR3 protein level was measured with flow cytometry. After stimulating PBMCs with specific ligands PolyI:C, cytokines IL-6, IL-8 and MCP-1 protein productions were assessed. **Results:** TLR3 mRNA and protein expression was significantly higher in the PBMCs of wet AMD patients than those in controls. However, the differences of TLR4 mRNA expression between the two groups were not significant. The PBMCs of wet AMD patients produced more IL-6 protein than the controls in response to PolyI:C, the ligand for TLR3. But there was no significant difference in MCP-1 production between wet AMD group and control group when stimulating PBMCs with PolyI:C. **Conclusion:** Our data suggest that upregulation of TLR3 signal pathways maybe a critical link in the pathogenesis of wet AMD.

[Key words] age-related macular degeneration; toll-like receptors; peripheral blood mononuclear cells; cytokines; retina

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是导致全世界 50 岁以上老年人群视力慢性不可逆性损害甚至失明的最主要的眼病, 特征性改变是玻璃膜疣形成和脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV)^[1]。其发病与多种因素有关, 近年来研究发现慢性炎症及补体激活在其病变过程中发挥着重要作用^[2-3], 但促发炎症及维持其炎性环境的机制尚不明确。

Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 家族是固有免疫系统重要组成部分, 每种 TLR 识别不同的病原微生物成分作为配体, 例如 TLR3 识别双链 RNA (PolyI:C)^[4], 激活后启动或加强局部炎症, 参与启动获得性免疫反应^[5]。人视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 表达 TLR3 及 TLR4, 其激活后可引起一系列炎症细胞因子和趋化因子的表达^[6]。研究发现 TLR4 配体脂多糖与 AMD 的发生呈正相关^[7]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是 CNV 形成最重要的促进因子, 高浓度 TLR3 配体 PolyI:C 刺激 RPE 细胞可使 VEGF 的表达增多^[8]。而研究发现在 CNV 动物模型中 siRNA 可通过激活 TLR3 发挥抗血管生成作用^[9]。综上所述, TLR3/4 与湿性 AMD 发病有密切关系, 然而其在湿性 AMD 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 的表达及其作用少见相关报道。

本研究从基因及蛋白水平检测了在湿性 AMD 患者 PBMCs 中 TLR3/4 的表达, 在相应特异性配体激活后检测下游细胞因子的表达, 从而探讨 TLRs 在湿性 AMD 发病过程中的作用, 以期进一步探讨 CNV 的形成机制, 为其治疗提供一定的理论和实验依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 AMD 组 本研究纳入本院门诊 2012 年 4 月至 10 月 25 例连续性 AMD 随访患者 (10 例男性; 14 例女性; 年龄 51~76 岁)。按湿性 AMD 国际诊断标准诊断^[10], 需排除患有系统性免疫性疾病、其他免疫相关的疾病及高血压、糖尿病、肾病、高脂血症、冠心病、心力衰竭、肾衰竭、近五年有癌症病史的患者。患者伴有糖尿病视网膜病变、息肉样血管改变或其他眼部炎症性疾病等均被排除本实验。所有患者在采集血液样本之前都未接受任何治疗。所有人进行了一系列眼科检查, 包括裂隙灯检查、眼底照相、眼底荧光造影 (fundus fluorescein angiography, FFA), 吲哚菁绿造影 (indocyanine green angiography, ICGA) 和光学相干断层扫描技术 (optical coherence tomography, OCT)。FFA 和 ICGA 使用共聚焦激光扫描系统 (Spectralis HRA, 德国) 同时进行。

1.1.2 对照组 纳入 24 例与病例组患者年龄相匹配的不患有 AMD 的健康体检者 (11 例男性; 13 例女性; 年龄 51~76 岁) 作为对照组。排除患有眼部疾病、免疫性及免疫相关的疾病、高血压、糖尿病、高脂血症、冠心病、心力衰竭、肾衰竭和其他

代谢性疾病的患者。本实验获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准(编号:2011-23)。所有程序均遵守赫尔辛基宣言,所有患者和健康对照者都以书面形式告知并同意参加本实验。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分离及培养条件 2组均采用空腹外周静脉血 10 ml,用 EDTA 抗凝后加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)1:1 稀释。然后加入淋巴细胞分离液(中国 TBD sciences 公司)以 800 r/min 离心 25 min 分离 PBMCs。取不少于 7×10^6 个/ml 细胞用 Trizol™(美国 Invitrogen 公司)裂解后冻存于 -80°C 。或用 RPMI1640 完全培养基(美国 Invitrogen 公司),(10%小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素)重悬,分组种于 24 孔培养板,细胞浓度为 1×10^6 个/ml。采用 50 $\mu\text{g/ml}$ PolyI:C(瑞士 Fluka 公司)刺激 48 h。采用湿性 AMD 患者及对照组各 15 例进行 real-time PCR 试验,因采用 2012 年 4 月至 10 月连续性 AMD 患者,故各采用 2 组后 6 例同时进行流式细胞术实验。采用 10 例湿性 AMD 患者及 9 例对照组进行 ELISA 检测。

1.2.2 Real-time PCR 法检测 PBMCs 的 TLR3、TLR4 mRNA 的表达水平 细胞总 RNA 使用 RNAiso Plus(中国 Takara 公司)按照说明书提取,接着使用逆转录试剂盒(中国 Takara 公司)逆转录为 cDNA 用于定量 PCR 研究。cDNA 采用 real-time PCR 在 Bio-Rad c-1000 仪器(美国 Bio-Rad 实验室)上进行,使用的引物序列如下:人 β -actin 上游:5'-GGATGCAGAAGG-AGATCACTG-3',下游:5'-CGATCCACACGGAGTACTTG-3';人 TLR3 上游:5'-CACTGTCTGCTACACGCAT-GGA-3',下游:5'-TTTCAAAAACCGTGTCTGTTAAGAGT-3';人 TLR4 上游:5'-AGTTTCCTGCAATGGATCAAGG-3';下游:5'-CTGCT-TATCTGAAGGTGTTGCA-3'。PCR 扩增在 20 μl 体系内加入 all-in-one qPCR Mix(美国 GeneCopoeia 公司)进行。反应条件如下:95 $^\circ\text{C}$ 30 s,95 $^\circ\text{C}$ 5 s,60 $^\circ\text{C}$ 34 s,40 个循环。PCR 扩增结束后绘制溶解曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测 TLR3 蛋白水平表达 为了检测 PBMCs 中 TLR3 蛋白的表达,在 4 $^\circ\text{C}$ 采用抗人 CD283(TLR3) PE(美国 eBioscience 公司)孵育 30 min,以鼠 IgG21 K Isotype Control PE 作为同型(eBioscience 公司)。PBS 洗涤后,100 μl PBS 重悬细胞,采用流式细胞仪(美国 BD 公司 FACSscan)检测。

1.2.4 ELISA 法检测细胞因子表达 收集上清液用于 ELISA 检测。IL-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemo-tactic protein 1,MCP-1)蛋白浓度采用 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)严格按照说明书进行检测,其最低浓度分别是 9.4、15.6 pg/ml 和 31.2 pg/ml。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行分析,正态分布数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,病例组和对照组的差异分析采用 *t* 检验。非正态分布数据用中位数表示,采用非参数统计,2 组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 湿性 AMD 患者 PBMCs TLR3 及 TLR4 mRNA 的表达

采用 15 例湿性 AMD 患者和 15 例正常对照的 PBMCs 细胞利用 real-time PCR 检测 TLR3 及 TLR4 的表达。如图 1 示,AMD 组 TLR3 的表达(2.413 ± 0.930)明显高于对照组(1.161 ± 0.360)(图 1A)($t=2.413, P=0.023$),但 TLR4 的表达在 AMD 组(1.437 ± 0.571)与对照组(1.155 ± 0.431)之间无统计学差异($t=1.026, P=0.313$)(图 1B)。

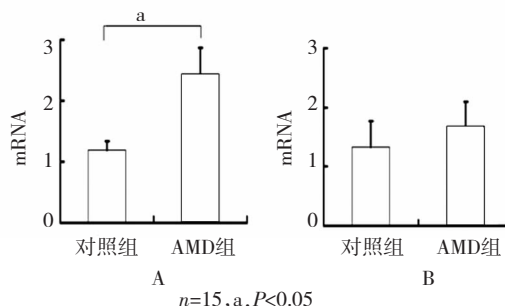


图 1 PBMCs TLR3 (A) 及 TLR4 (B) mRNA 表达

Fig.1 Expression of TLR3 (A) and TLR4 (B) mRNA in PBMCs of wet AMD patients

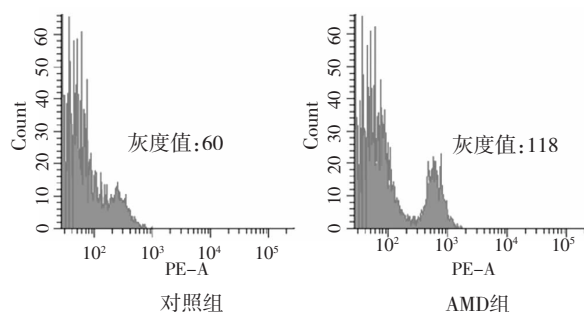


图 2 流式细胞仪检测 TLR3 蛋白的表达

Fig.2 Representative TLR3 protein expression measured by flow cytometry

2.2 湿性 AMD 患者 PBMCs TLR3 蛋白的表达

在实验方法 1.2.2 中发现在 PBMCs 中,AMD 组 TLR3 在 mRNA 水平的表达显著高于对照组,而 TLR4 的 mRNA 表达在两组之间无统计学差异,故采用 6 例湿性 AMD 患者和 6 例正常对照利用流式细胞仪检测 TLR3 蛋白水平的表达(图 2)。如图 3 所示,与 mRNA 水平表达一致,在蛋白水平 AMD 组 TLR3 的表达(101.30 ± 26.49)较对照组(40.30 ± 12.06)明显增高($t=5.08, P=0.01$)。

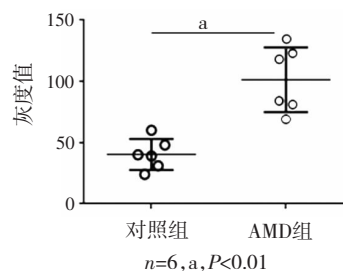
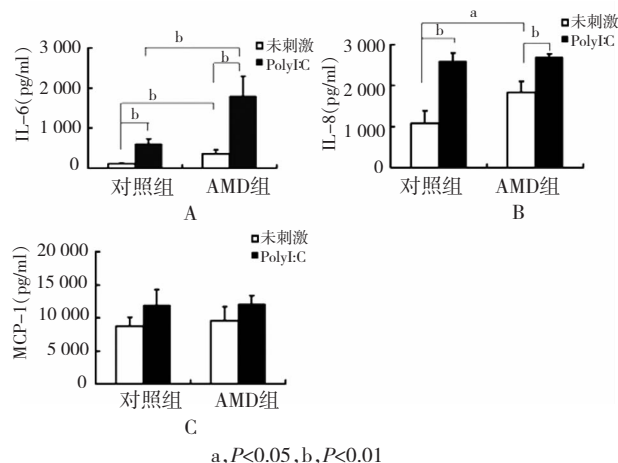


图 3 AMD 组 PBMCs TLR3 蛋白水平的表达

Fig.3 TLR3 protein expression in PBMCs of wet AMD patients

2.3 TLR3 配体刺激后 AMD 组 PBMCs IL-6 的表达升高

TLRs 主要通过调节细胞因子的表达而控制炎症反应, IL-6、IL-8、MCP-1 在湿性 AMD 患者房水中的浓度显著升高,提示其与 AMD 的发病发展密切相关^[11-12]。在 10 例 AMD 患者和 9 例正常对照 PBMCs 中利用 ELISA 法检测 TLR3 配体刺激前后细胞因子的表达。如图 4 所示,未予配体刺激时,AMD 组 PBMCs IL-6 和 IL-8 的表达明显高于对照组,但是 MCP-1 的表达在 2 组之间无统计学差异。



a, $P < 0.05$, b, $P < 0.01$

图 4 PBMCs TLR3 配体刺激后 AMD 组 ($n=10$) 及对照组 ($n=9$) 细胞因子 IL-6 (A)、IL-8 (B) 及 MCP-1 (C) 的表达

Fig.4 Expression of IL-6 (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) in AMD group ($n=10$) and control group ($n=9$) after TLR3 ligand stimulation in PBMCs

已证实 AMD 组 TLR3 在 mRNA 及蛋白水平的表达均显著高于对照组,作者进一步探讨当予以 TLR3 特异性配体刺激后,AMD 组 PBMCs IL-6、IL-8 和 MCP-1 的表达。PolyI:C (50 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 48 h 后,AMD 组与对照组 IL-6 和 IL-8 的表达均较前升高。然而,AMD 组 PBMCs IL-6 的表达(1 579.555, 1 185.36~2 783.71)明显高于对照组(671.21, 290.85~911.46) ($Z=3.67, P<0.01$), IL-8 的表达在对照组 (24 220.09, 20 423.54~32 497.09) 及 AMD 组 (26 184.61, 20 665.15~36 540.97) 之间无统计学差异 ($Z=0.49, P=0.62$)。而在 PolyI:C 刺激后, MCP-1 的表达在 AMD 组 (11 093.84, 7 262.012~1774.8) 与对照组 (10 985.42, 9 003.29~15 218.16) 之间均无统计学差异 ($Z=1.38, P=0.16$) (图 4)。

3 讨论

近期研究发现湿性 AMD 患者的病变过程与慢性炎症反应密切相关,免疫因素发挥着重要的作用,免疫系统基因功能的改变将导致 AMD 的发病发展^[13]。补体因子 H (complement factor H, CFH) 是补体活化过程中的抑制性调节蛋白,在旁路激活途

径中与 C3b 结合,抑制 C3 转化酶形成,从而调控补体活化程度及其激活反应的进程^[3]。进一步探索免疫系统参与 AMD 病变过程的机制,可以为 AMD 的治疗提供新的理论依据。

TLRs 家族可以识别病原相关的分子模式,激活后迅速启动炎症反应,调控一系列细胞因子的表达,对固有性和获得性免疫反应起着重要调节作用^[9]。TLRs 在眼部组织中广泛表达,在对各种病原体的防御中发挥着重要作用^[6]。本实验发现在湿性 AMD 患者 PBMCs 中 TLR3 mRNA 表达较正常人显著升高,与 mRNA 表达水平一致,湿性 AMD 患者 TLR3 蛋白表达水平较正常人显著升高,TLR4 的表达则无显著差异,提示湿性 AMD 患者外周血 TLR3 受到内源性或者外源性配体的刺激,其表达升高,由此 TLR3 的高表达可以做为湿性 AMD 的一个非特异性生物标志物。

临床及实验性研究表明 TLR3 与湿性 AMD 的发病有着密切的联系,在正常对照眼球与 CNV 患者眼球 RPE 细胞中,TLR3 的着色有着显著的差异,所有 CNV 眼组织细胞膜均表达 TLR3^[14]。同时在人 RPE 细胞 PolyI:C 刺激活化 TLR3 后,VEGF 分泌明显增多,从而促进 CNV 的发展^[8]。本实验也证实 TLR3 的高表达与湿性 AMD 发病相关。然而有研究发现 PolyI:C 及 siRNA 可抑制 CNV 模型鼠中 CNV 的产生,对 TLR3 基因敲除鼠 CNV 的生长无影响,说明其主要通过活化 TLR3 抑制 CNV 的生长^[9]。另外 2 个实验也证实了 siRNA 可以抑制 CNV 模型鼠中新生血管的产生^[15-16]。在干性 AMD, TLR3 412Phe 变异体可以减少 RPE 细胞的死亡,从而抑制地图样萎缩的产生^[17], siRNA 通过激活 RPE 细胞 TLR3 的表达诱导鼠视网膜变性^[18],提示 TLR3 的活化促进了干性 AMD 的发展。这些研究说明 TLR3 及其信号通路在干性及湿性 AMD 的作用尚有待深入的研究。

研究发现在湿性 AMD 患者眼球中, IL-6、IL-8 及 MCP-1 的眼内浓度与黄斑水肿的体积显著正相关^[11-12]。在 AMD 患者的外周血中 IL-6 的表达升高,并与 AMD 的严重程度相关^[9]。因 TLR3 在 AMD 患者中高表达,故进一步探讨 TLR3 的高表达是否和与 AMD 病变过程相关的细胞因子的表达有关。与之前研究一致,本实验通过检测 AMD 组和对照组中未刺激 PBMCs 上清液,发现湿性 AMD 患者 PBMCs IL-6 及 IL-8 的表达较正常人明显增高,提示在湿性 AMD 患者外周血中, IL-6 及 IL-8 的高表达可能

与 TLR3 的高表达有关。在予以 PolyI:C 刺激后,对照组及 AMD 组 IL-6、IL-8 的表达均升高,但 AMD 组 IL-6 的表达显著高于对照组。提示 AMD 组 PBMCs TLR3 对其配体的反应活性高于对照组,TLR3 可能通过促进 IL-6 的表达而有助于维持炎性环境,从而参与 AMD 的发病发展。

在人 RPE 细胞中,TLR3 活化后可引起炎症细胞因子和趋化因子的表达增多,例如 IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1^[20],本研究也发现 TLR3 活化后 AMD 组 PBMCs IL-6 的表达显著高于对照组,提示 IL-6 在 AMD 患者外周血及内眼表达升高,在 RPE 细胞中,IL-6 可以降低 CFH 的表达^[21]。而 CFH 通过失活 C3b 降低补体的促炎性效应,从而控制局部炎症反应^[22]。因此,作者推测在湿性 AMD 中可能形成了一个可以增强炎症反应和控制补体活化的正反馈。

总之,本研究发现在 AMD 患者 PBMCs 中,TLR3 的表达和反应活性显著升高,TLR3 及其信号通路与湿性 AMD 的慢性炎症性病程有密切的关系,但其促炎性作用的具体机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies [J]. *Surv Ophthalmol*, 2003, 48(3): 257-293.
- [2] Nussenblatt RB, Liu B, Li Z. Age-related macular degeneration: an immunologically driven disease [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(5): 434-442.
- [3] Charbel IP, Chong NV, Scholl HP. The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration—current evidence and translation into clinical application [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(2): 163-174.
- [4] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3 [J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.
- [5] Ozato K, Tsujimura H, Tamura T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system [J]. *Biotechniques*, 2002(s): 66-68.
- [6] Kumar MV, Nagineni CN, Chin MS, et al. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells [J]. *J Neuroimmunol*, 2004, 153(1-2): 7-15.
- [7] Robman L, Mahdi O, McCarty C, et al. Exposure to Chlamydia pneumoniae infection and progression of age-related macular degeneration [J]. *Am J Epidemiol*, 2005, 161(11): 1013-1019.
- [8] Klettner A, Koinzer S, Meyer T, et al. Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells—Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion [J]. *Acta Ophthalmol*, 2013. doi: 10.1111/aos.12031 [Epub ahead of time].
- [9] Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3 [J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 591-597.
- [10] Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group [J]. *Surv Ophthalmol*, 1995, 39(5): 367-374.
- [11] Miao H, Tao Y, Li XX. Inflammatory cytokines in aqueous humor of patients with choroidal neovascularization [J]. *Mol Vis*, 2012(18): 574-580.
- [12] Jonas J B, Tao Y, Neumaier M, et al. Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration [J]. *Acta Ophthalmol*, 2012, 90(5): e381-e388.
- [13] Wei L, Liu B, Tuo J, et al. Hypomethylation of the IL17RC promoter associates with age-related macular degeneration [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(5): 1151-1158.
- [14] Maloney SC, Anteckla E, Orellana ME, et al. Choroidal neovascular membranes express toll-like receptor 3 [J]. *Ophthalmic Res*, 2010, 44(4): 237-241.
- [15] Ashikari M, Tokoro M, Itaya M, et al. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by nontargeted siRNA [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(7): 3820-3824.
- [16] Gu L, Chen H, Tuo J, et al. Inhibition of experimental choroidal neovascularization in mice by anti-VEGFA/VEGFR2 or non-specific siRNA [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(3): 433-439.
- [17] Yang Z, Stratton C, Francis PJ, et al. Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(14): 1456-1463.
- [18] Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, et al. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3 [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 101-108.
- [19] Nussenblatt RB, Ferris F 3rd. Age-related macular degeneration and the immune response: implications for therapy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2007, 144(4): 618-626.
- [20] Wornle M, Merkle M, Wolf A, et al. Inhibition of TLR3-mediated proinflammatory effects by Alkylphosphocholines in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(9): 6536-6544.
- [21] Chen M, Forrester JV, Xu H. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(4): 635-645.
- [22] Soames CJ, Sim RB. Interactions between human complement components factor H, factor I and C3b [J]. *Biochem J*, 1997, 326(Pt 2): 553-561.

(责任编辑: 关蕴良)