

眼科研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000352

在湿性年龄相关性黄斑变性中 Toll 样受体系统 对补体系统的作用

钱 丹,代炳灵,钟沐睿,彭 惠
(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨在湿性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)病人中 Toll 样受体(toll like receptor,TLR)2、3 对补体 C3a、C5a 的作用。**方法:**收集 15 例湿性 AMD 病人及 15 例正常人外周血,采用梯度离心法分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs),将细胞分为空白组、C3a 组、C5a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C3a 组、TLR3 作用 C5a 组共 7 个组并分别给予对应刺激。收集上清液,采用 ELISA 法检测 AMD 相关细胞因子白细胞介素(interleukin,IL)-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的含量。**结果:**正常人及湿性 AMD 病人中,TLR2 作用 C3a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C3a 组、TLR3 作用 C5a 组上清液中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MCP-1 的量均高于 C3a 组或 C5a 组;湿性 AMD 病人中,空白组、C3a 组、C5a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C3a 组、TLR3 作用 C5a 组上清液中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MCP-1 的量较正常人对组明显升高。**结论:**Toll 样受体系统对补体系统的作用有可能促进了湿性 AMD 的发生发展。

【关键词】Toll 样受体;补体;湿性年龄相关性黄斑变性;炎症因子

【中图分类号】R774.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-21

Effects of Toll-like receptors on complement system in patients with wet-age-related macular degeneration

Qian Dan, Dai Bingling, Zhong Murui, Peng Hui

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

【Abstract】Objective: To explore the effects of Toll-like receptors (TLR2, TLR3) on C3a and C5a in patients with wet-age-related macular degeneration (wet-AMD). **Methods:** Peripheral blood samples were collected from 15 patients with wet-AMD and 15 subjects without wet-AMD were taken as controls. Peripheral blood mononuclear cells were then isolated using gradient centrifugation. The isolated cells were divided into 7 groups: blank group, C3a group, C5a group, TLR2 on C3a group, TLR2 on C5a group, TLR3 on C3a group and TLR3 on C5a group. Stimulations were added to each group. The supernatant was collected and tested for concentration of AMD-related cytokines, such as interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8, interleukin-17, monocyte chemoattractant protein-1, vascular endothelial growth factor by using ELISA. **Results:** The concentrations of interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 were higher in TLR2 on C3a group, TLR2 on C5a group, TLR3 on C3a group and TLR3 on C5a group than in C3a group or C5a group. Concentrations of interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 were obviously increased in blank group, C3a group, C5a group, TLR2 on C3a group, TLR2 on C5a group, TLR3 on C3a group and TLR3 on C5a group of patients with wet-AMD than in corresponding group of subjects without wet-AMD. **Conclusion:** The effects of Toll-like receptors on the complement system may promote the development of wet-AMD.

【Key words】 Toll-like receptors; complement; wet-age-related macular degeneration; cytokine

年龄相关性黄斑变性(age-related macular de-

generation, AMD)是一种常见的不可逆致盲性眼病,已经成为全球第三大致盲病因。在我国,随着经济水平的发展,人均寿命逐渐延长和老龄化现象日益严重,AMD 的发病率呈明显的上升趋势^[1]。临床上根据病变特点将 AMD 分为 2 种主要类型:一是干性 AMD,又称为萎缩型或非渗出型 AMD,严重时

作者介绍:钱 丹,Email:464704976@qq.com,

研究方向:眼底病。

通信作者:彭 惠,Email:pengh9@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(编号:2012-1-026)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000352.html>

表现为地图状萎缩、视网膜色素异常和玻璃膜疣,并形成萎缩斑,导致相应区域内光感受器受损、中心视力显著下降;二是湿性 AMD,又称新生血管型或渗出型 AMD,主要表现为黄斑区出现脉络膜新生血管(choroidal neovascularization,CNV),CNV 进一步发展引起视网膜渗出、神经组织变性、出血和瘢痕形成,继而导致中心视力急剧下降甚至不可逆性丧失。研究显示湿性 AMD 的患病率虽然占总患病率的 10%左右,但 90%的 AMD 致盲是由湿性 AMD 所致^[2]。

补体途径异常被认为是黄斑部细胞病变的诱因,包括萎缩、变性和新生血管形成。研究表明给予 CNV 模型鼠补体 C3a 及 C5a 刺激后,CNV 面积明显增多,在 AMD 病人的脉络膜层中发现 C3a 及 C5a 的异常沉积^[3],并且在 AMD 病人血浆中也发现 C3a 及 C5a 的水平高于正常对照组^[4]。Toll 样受体(toll like receptors,TLRs)属于模式识别受体,是天然免疫系统重要组成部分,迄今在人体发现了 10 种家族成员(TLR-1~10)。研究发现肺炎衣原体抗原可通过激活视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium,RPE)中 TLR2 的表达引起细胞因子血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和 IL-6 的分泌促进 CNV 的生长^[5]。与正常对照眼球相比,CNV 患者眼球 RPE 中,TLR3 的着色有明显的差异且所有 CNV 眼组织细胞膜均表达 TLR3^[6]。同时在人眼 RPE 细胞上,TLR3 的配体聚肌苷酸胞苷酸[polyinosinic-polycytidylic acid,Poly(I:C)]刺激活化 TLR3 后,VEGF 的分泌明显增多,进而促进了 CNV 的发展^[7]。TLR3 及 TLR4 的多态性与干性及湿性 AMD 的发病密切相关^[8]。本课题组前期研究发现在外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)水平上,湿性 AMD 患者组 TLR2、TLR3 在信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid,mRNA)及蛋白水平的表达均高于健康人组,而 TLR1、4~10 的表达在 2 组之间则无显著差异^[9]。近年来的文献也支持 2 个系统之间存在着相互之间的跨界调节作用,但在年龄相关性黄斑变性中 TLRs 系统与补体系统的相互作用尚未明确,本研究旨在说明 TLRs 对补体系统的作用促进湿性 AMD 的发生发展。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 15 例 AMD 患者(7 男 8 女,年龄 54~83 岁)纳入本研究,所有患者均进行了一系列眼科检查,包括裂隙

灯检查、眼底照相、光学相干断层扫描(optical coherence tomography,OCT)、眼底荧光造影(fluorescein fundus angiography,FFA)、吲哚菁绿造影(indocyanine green angiography,ICGA),眼科检查及重庆医科大学眼科主任医师彭惠教授证实所有患者均患 AMD。所有患者均没有患糖尿病、高血压、高脂血症、肝病、肾病和其他代谢性疾病。所有患者在采集血液样本前都没有接受任何治疗。

1.1.2 对照组 15 名正常人(7 男 8 女,年龄 52~77 岁)作为对照组,其与病例组在性别、年龄相匹配,并进行了一些常规身体检查以明确他们都没患糖尿病、高血压、高脂血症、肝病、肾病和其他代谢性疾病。所有患者和正常对照者都以书面形式告知并同意参加本研究。本研究得到重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血的收集与分组刺激 抽取湿性 AMD 病人及正常人血液 20 ml,采用淋巴细胞分离液(中国 TBD sciences 公司)梯度离心法分离出 PBMCs,计数后按每孔 1×10^6 个接种于 24 孔板中,每孔分别给予含 10%胎牛血清、1%双抗、89%的 1640 培养液 1 ml(美国 Invitrogen 公司)。按空白组、C3a 组、C5a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C3a 组、TLR3 作用 C5a 组给予对应刺激,(TLRs 作用补体组均予以 TLRs 配体预处理 30 min 后,清洗细胞 3 次,再予以相应补体刺激),最后于 37 °C、体积分数 95%空气、5%CO₂ 常规培养箱培养 12 h 后,离心收集上清液于 -80 °C 冰箱冻存。

1.2.2 ELISA 法测定上清液中各种细胞因子浓度 采用 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)并严格按照内附说明书测定 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、MCP-1、VEGF 的浓度,应用多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)读取结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件(美国 SPSS 公司)进行分析,各组计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。正常人与湿性 AMD 病人对应组两两比较采用 Mann-Whitney U 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。正常人或湿性 AMD 病人中,C3a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR3 作用 C3a 组 3 组相比较,以及 C5a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C5a 组 3 组相比较,分别采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,检验水准 $\alpha=0.05$;其进一步两两比较采用 Nemenyi 检验,检验水准按照 Bonferroni 法进行调整,检验水准 $\alpha=0.025$ 。

2 结果

2.1 正常人及湿性 AMD 病人各组 IL-1 β 的含量

与正常人空白组、C3a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR3 作用 C3a 组、C5a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C5a 组相比,湿性 AMD 病人所对应的各组上清液中 IL-1 β 的量明显升高(P 值分别为 0.003、0.000、0.001、0.000、0.000、0.000、0.000),各组 IL-1 β 的量及比较分析见表 1。

正常人中:C3a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR3 作用 C3a 组 3 组上清液中 IL-1 β 的含量差别具有统计学意义($H=31.525, P=0.000$);TLR2 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 IL-1 β 的含量

表 4 MCP-1 在各组上清液中的含量及比较分析 ($\bar{x} \pm s, n=15, \text{pg/ml}$)Tab.4 Comparison of MCP-1 concentration in the supernatant of each group ($\bar{x} \pm s, n=15, \text{pg/ml}$)

组别	空白组	C3a组	TLR2作用 C3a 组	TLR3作用 C3a 组	C5a组	TLR2作用 C5a 组	TLR3作用 C5a 组
正常人	2 548.7 ± 797.6	1 804.3 ± 549.7	4 951.7 ± 1 054.3	12 169.1 ± 3 660.6	5 102.5 ± 1 362.0	7 803.3 ± 2 854.1	15 589.7 ± 4 749.8
湿性 AMD 病人	4 188.1 ± 1204.9	4 054.2 ± 1 024.8	10 507.1 ± 2 321.5	16 881.0 ± 4 037.0	15 053.2 ± 5 262.6	22 727.5 ± 4 728.9	21 237.9 ± 5 680.5
Z 值	-3.795	-4.583	-4.542	-2.468	-4.666	-4.666	-2.676
P 值	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.007

3组上清液中 IL-8 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=29.353, P=0.000$); TLR2 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=22.345, P=0.000$), TLR3 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=21.680, P=0.000$)。C5a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C5a 组 3 组上清液中 IL-8 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=34.749, P=0.000$); TLR2 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=8.194, P=0.017$), TLR3 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=34.739, P=0.000$)。

湿性 AMD 病人中: C3a 组、TLR2 作用 C3a 组和 TLR3 作用 C3a 组 3 组上清液中 IL-8 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=29.585, P=0.000$); TLR2 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=19.781, P=0.000$), TLR3 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=24.359, P=0.000$)。C5a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C5a 组 3 组上清液中 IL-8 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=30.554, P=0.000$); TLR2 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=17.168, P=0.000$), TLR3 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 IL-8 的含量升高 ($\chi^2=27.460, P=0.000$)。

2.4 正常人及湿性 AMD 病人各组 MCP-1 的含量

与正常人空白组、C3a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR3 作用 C3a 组、C5a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C5a 组相比, 湿性 AMD 病人所对应的各组上清液中 MCP-1 的量明显升高 (P 值分别为 0.000、0.000、0.000、0.014、0.000、0.000、0.007), 各组 MCP-1 的量及比较分析见表 4。

正常人中: C3a 组、TLR2 作用 C3a 组、TLR3 作用 C3a 组 3 组上清液中 MCP-1 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=38.447, P=0.000$); TLR2 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=10.140, P=0.006$), TLR3 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=38.437, P=0.000$)。C5a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C5a 组 3 组上清液中 MCP-1 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=29.785, P=0.000$); TLR2 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=7.696, P=0.022$), TLR3 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=29.354, P=0.000$)。

湿性 AMD 病人中: C3a 组、TLR2 作用 C3a 组和 TLR3 作用 C3a 组 3 组上清液中 MCP-1 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=36.696, P=0.000$); TLR2 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=11.131, P=0.004$), TLR3 作用 C3a 组较 C3a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=36.566, P=0.000$)。

C5a 组、TLR2 作用 C5a 组、TLR3 作用 C5a 组 3 组上清液中 MCP-1 的含量差别具有统计学意义 ($H_c=14.089, P=0.000$); TLR2 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=12.306, P=0.002$), TLR3 作用 C5a 组较 C5a 组上清液中 MCP-1 的含量升高 ($\chi^2=8.546, P=0.014$)。

2.5 正常人及湿性 AMD 病人各组 VEGF、IL-17 的含量
各组中 VEGF、IL-17 的量均未检测出。

3 讨 论

研究显示当宿主受到感染侵袭时, 补体系统和 TLRs 系统都会被迅速激活, 建立起重要的第一道防御体系, 两者也可以同时调节先天性免疫和获得性免疫, 满足宿主免疫反应的正常运行, 这使补体系统和 TLRs 系统发生协调作用成为可能。近年来的文献也支持在其他疾病中 2 个系统之间存在着跨界调节作用^[10-13]。TLRs 系统信号通路可使得补体系统受体超激活, 在单核细胞和巨噬细胞中, TLR2 信号通路被激活后, 可通过 Ras 相关的 C3 肉毒基体 1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) 和细胞附着蛋白-1 活化补体受体 3 (complement receptor-3, CR3), 提高 CR3 摄取病原体, 增强其吞噬效应^[14]。在正常人外周血 PBMCs 上, TLRs 的活化可明显提高细胞对 C5a 的敏感性, TLRs 配体预处理后, C5a 诱导的促炎性应答明显提高, IL-6、IL-8 的表达增加。但这种作用并不是通过提高 C5aR 的表达或者调解 C5a 诱导的 Ca^{2+} 的流动, 而是通过降低 C5L2 的活性实现的。当抑制 C5L2 后或者在 C5L2 基因敲除小鼠中, TLRs 诱导的细胞对 C5a 的高敏性消失^[15]。

课题组前期研究发现在 PBMCs 水平上, 湿性 AMD 患者组 TLR2、TLR3 在 mRNA 及蛋白水平的表达均高于正常人对照组, 而 TLR1、4~10 的表达在 2 组之间无明显差异。与正常人对照组相比, TLR2 的配体 PGN 刺激后, 湿性 AMD 组 IL-6、IL-8 的表达明显增多, TLR3 的配体 PolyI:C 刺激后, 湿性 AMD

组 IL-6 的表达明显增多^[7]。本研究选择 TLR2、TLR3、C3a、C5a 为研究对象,研究结果显示在 TLR2、TLR3 配体预处理后,C3a、C5a 诱导的促炎性应答明显提高,IL-1 β 、IL-6、IL-8、MCP-1 的表达增加,并且该效应在湿性 AMD 病人中明显加强。IL-17 及 VEGF 的值未测出,考虑与本研究刺激量有关。研究结果符合本研究的预期猜想,由于湿性 AMD 病人存在外周血 C3a、C5a 的高水平以及 PBMCs 上 TLR2 和 TLR3 高表达这一特殊的微环境,故本研究模拟湿性 AMD 病人外周血状态,提取湿性 AMD 病人 PBMCs,给予 TLRs 配体激活 TLRs 系统,从而诱导细胞提高对补体系统的敏感性,再加入与外周血微环境相似的高水平 C3a 和 C5a,从而使得加入的补体成分诱导的炎性反应增强。而正常人与湿性 AMD 病人差别就在于在正常人 PBMCs 上没有高表达的 TLR2 及 TLR3,给予相同 TLRs 配体刺激,TLRs 系统也不能得到充分激活,再给予同湿性 AMD 病人相同剂量补体刺激,却不能出现湿性 AMD 病人的实验结果。同样作者在正常人及湿性 AMD 病人中也发现加入 TLRs 配体刺激比补体单独刺激产生的炎性因子增加,这一结果与 Raby 等研究结论^[15]相符,同样证实 TLRs 的确有可能提高细胞对补体系统的敏感性,使得补体系统产生的炎性反应加强。本研究结果提示在湿性 AMD 病人中,TLRs 可以提高补体系统的促炎作用并可能与湿性 AMD 发病的免疫炎症机制有关,从而促进湿性 AMD 的发生发展,这为更全面了解湿性 AMD 的发病机制提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Zou HD, Zhang X, Xu X, et al. Prevalence study of age-related macular degeneration in Caojiadu blocks[J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2005, 41(1): 15-19.
- [2] Liljekvist-Soltic I, Olofsson J, Johansson K. Progenitor cell-derived factors enhance photoreceptor survival in rat retinal explants[J]. Brain Res, 2008, 1227(3): 226-233.
- [3] Rohrer B, Coughlin B, Kunchithapautham K, et al. The alternative pathway is required, but not alone sufficient, for retinal pathology in mouse laser-induced choroidal neovascularization[J]. Mol Immunol, 2011, 48(6-7): e1-e8.
- [4] Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, et al. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(12): 5818-5827.
- [5] Fujimoto T, Sonoda KH, Hijioka K, et al. Choroidal neovascularization enhanced by Chlamydia pneumoniae via Toll-like receptor 2 in the retinal pigment epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(9): 694-702.
- [6] Maloney SC, Anteck E, Orellana ME, et al. Choroidal neovascular membranes express toll-like receptor 3[J]. Ophthalmic Res, 2010, 44(4): 237-241.
- [7] 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, 91(3): e211-e218.
- [8] Edwards AO, Chen D, Fridley BL, et al. Toll-like receptor polymorphisms and age-related macular degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(4): 52-59.
- [9] 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[J]. Molecular vision, 2013(19): 1826-1833.
- [10] Damman J, Daha MR, van Son WJ, et al. Crosstalk between complement and Toll-like receptor activation in relation to donor brain death and rena ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Transplant, 2011, 11(4): 660-669.
- [11] Hajishengallis G, Lambris JD. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system[J]. Trends Immunol, 2010, 31(4): 154-163.
- [12] Holst B, Raby AC, Hall JE, et al. Complement takes its Toll: an inflammatory crosstalk between Toll-like receptors and the receptors for the complement anaphylatoxin C5a[J]. Anaesthesia, 2012, 67(1): 60-64.
- [13] Zaal A, Lissenberg-Thunnissen SN, van Schijndel G, et al. Crosstalk between Toll like receptors and C5a receptor in human monocyte derived DCs suppress inflammatory cytokine production[J]. Immunobiology, 2013, 218(2): 175-180.
- [14] Hajishengallis G, Wang M, Liang S, et al. Subversion of innate immunity by periodontopathic bacteria via exploitation of complement receptor-3[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 632: 203-219.
- [15] Raby AC, Holst B, Davies J, et al. TLR activation enhances C5a-induced pro-inflammatory responses by negatively modulating the second C5a receptor, C5L2[J]. Eur J Immunol, 2011, 41(9): 2741-2752.

(责任编辑: 冉明会)