

氧化应激及补体在年龄相关性黄斑变性发病中的作用机制

向艳芳, 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

作者简介:向艳芳,女,毕业于重庆医科大学,硕士,研究方向:眼底病学。

通讯作者:彭惠,女,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病学. pengh9@yahoo.com.cn

收稿日期:2013-04-20 修回日期:2013-07-12

Mechanism of oxidative stress and complement in the pathogenesis of age-related macular degeneration

Yan-Fang Xiang, Hui Peng

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

Correspondence to: Hui Peng. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. pengh9@yahoo.com.cn

Received:2013-04-20 Accepted:2013-07-12

Abstract

• Age-related macular degeneration (AMD), one of the most common causes of elderly blindness, is a complex disease results from environmental and genetic factors. AMD pathogenesis is associated with chronic oxidative stress, immune and inflammatory damage. We make a simple generalization of oxidative stress and complement in the pathogenesis of AMD in this article.

• KEYWORDS: age - related macular degeneration; oxidative stress; complement

Citation: Xiang YF, Peng H. Mechanism of oxidative stress and complement in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(8):1579-1582

摘要

年龄相关性黄斑变性(AMD)是受环境和遗传因素共同影响的一种复杂疾病,目前已成为老年人最普遍的致盲原因之一。其发病机制与长期的慢性氧化应激及免疫炎症反应对组织的损伤密切相关。以下将氧化应激、补体及局部炎症在AMD发病中的作用机制作简要综述。

关键词:年龄相关性黄斑变性;氧化应激;补体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.18

引用:向艳芳,彭惠.氧化应激及补体在年龄相关性黄斑变性发病中的作用机制.国际眼科杂志2013;13(8):1579-1582

0 引言

年龄相关性黄斑变性(AMD)病因复杂,目前已明确年龄、吸烟、家族遗传、性别、高血压、高血脂、动脉硬化等是AMD患者病情进展的高危因素。关于AMD发病的具体机制尚未明确,但随年龄增长逐渐增强的氧化应激对视网膜色素上皮(RPE)细胞的损害及局部炎症、免疫反应在AMD发病中的作用逐渐受到重视。

1 视网膜色素上皮细胞中的氧化应激反应

1.1 活性氧的产生 氧化应激是活性氧诱导细胞内蛋白异常折叠从而导致细胞功能障碍及损伤的过程,在AMD的发病中占有重要地位。RPE位于感光外节和脉络膜间,丰富的脉络膜血供使其长期处于高氧环境中;RPE细胞通过吞噬降解脱落的感光外节来维持细胞的稳定性,在该过程中感光外节内存留的不饱和脂肪酸可氧化产生包括脂肪醛自由基在内的大量活性氧,由于内源性活性氧的生成,RPE细胞的吞噬过程本身就是一个氧化应激反应;另外,RPE细胞内含有的丰富光敏剂在持续强光刺激下可诱导产生活性氧。

1.2 活性氧对细胞的损害 线粒体作为活性氧的重要来源最易受到其直接损伤。线粒体脱氧核糖核酸(Mt-DNA)缺乏组蛋白和其他DNA蛋白的保护且直接暴露在产生活性氧的呼吸链微环境中,易受到活性氧的直接攻击。Mt-DNA编码电子运输相关蛋白,其损伤可能致线粒体信使核糖核酸(mRNA)及蛋白质合成的下降。活性氧的产生及其对线粒体的损害引起电子转运障碍,形成氧化损伤的恶性循环。线粒体有氧呼吸链是机体产生三磷酸腺苷(ATP)的主要来源,呼吸链的破坏可导致细胞供能不足而引起细胞功能缺陷。随年龄增长,细胞供能缺陷逐渐严重进而导致年龄相关性细胞生理供能下降,引起细胞衰老。由于细胞内含丰富的抗氧化酶及有效的修复系统,这种氧化损伤在年轻时不易显现,随年龄增长损伤不断累积且抗氧化酶活性逐渐降低即可出现视网膜功能改变和细胞的死亡最终导致视力下降,这种年龄相关的氧化改变被认为是早期老年性黄斑变性的标志^[1]。

脂质过氧化是不饱和脂肪酸与多种氧衍生物相互作用的复杂链式反应过程,可产生较多活性亲电子醛和自由基。这些物质损害细胞膜的完整性、流动性及功能从而对

细胞产生毒性作用^[2]。体内产生的内源性醛主要有4-羟基-2-壬烯醛,丙二醛,丙烯醛,巴豆醛,甲基乙二醛。RPE由于含丰富的不饱和脂肪酸极易发生脂质过氧化反应^[3]。

蛋白质作为细胞的主要结构,是氧化应激反应的主要靶分子^[4]。直接氨基酸反应、多肽链裂解及蛋白质转化的衍生物均涉及蛋白质氧化,已明确这些蛋白质的修饰需要金属离子的介导。所有蛋白质的氨基酸残基在金属离子存在情况下容易被OH⁻或H₂O₂氧化损伤,如转化为3,4-二甲氧苯乙胺衍生物,而这种衍生物本身经过氧化还原反应可产生更多的活性氧而损害细胞^[5]。另一类氨基酸修饰是氨基酸残基直接氧化生成不可逆的羰基基团,这种羰基在脂质过氧化反应中产生并与蛋白质结合损害蛋白质功能^[6]。蛋白质骨架通常含有亲OH⁻的 α -氢原子结构氨基酸,在有氧环境中其可以产生碳原子为中心的自由基衍生物,导致肽键和蛋白质主链的裂解^[4]。

1.3 氧化损伤与 AMD 细胞丢失,脂褐质积累,Bruch膜改变和玻璃膜疣沉积是视网膜年龄相关性改变的标志,五六十岁后这些改变对视网膜功能开始产生影响。随年龄增加许多组织细胞的抗氧化水平降低而活性氧产生增加。虽视网膜神经层和RPE含丰富酶类及非酶类抗氧化剂,但活性氧水平及引起的氧化损伤与视网膜的老化呈正相关^[7]。在研究氧化应激对视网膜的损伤中发现随年龄增长视网膜RPE细胞内增加的物质包括:光诱导下产生大量活性氧的脂褐质^[8],损伤的线粒体DNA^[9],羧乙基吡咯蛋白复合物^[10],8-羟基脱鸟苷酸^[11],脂质过氧化及糖化终产物,4-羟基壬烯醛(4HNE)和丙二醛(MDA)等。目前已在小鼠模型上明确了氧化应激与AMD有密切关系,在超氧化物歧化酶1(SOD1)或SOD2缺陷的小鼠体内发现活性氧(ROS)水平升高并出现AMD的临床表现^[12,13]。目前报导的一种新型AMD动物模型指出中断核因子E2相关因子2(Nrf2)基因增加视网膜病变检出率。Nrf2是调控氧化应激和几种抗氧化酶表达重要转录因子,敲除Nrf2基因小鼠的视网膜表现为与人类AMD相似的病理改变,如过度的自噬、氧化损伤和炎症^[14]。在老化视网膜中自由基和氧化脂蛋白被认为是组织损伤的主要原因,且在局部组织中能触发低度炎症反应。

2 炎症与 AMD

AMD不属于特征性的炎性疾病,但长期的慢性炎症是AMD发生发展的重要因素。低度炎症又称para-inflammation,是机体或组织从基础水平开始转向炎症的一个临界状态,属于一种机体的适应性反应。在该阶段无明显组织损伤,但若长期处于持续的应激状态则可转化为慢性炎症引起人类许多年龄相关性疾病,如AMD^[15]。退行性疾病与病理或生理性炎症都有着或多或少的联系,尤其在依赖非再生细胞发挥功能的组织中,如视网膜黄斑区。这些细胞长期处于高代谢及强氧化应激环境中。在视盘结构中,低度炎症表现为血-视网膜屏障的破坏,小胶质细胞活化以及脉络膜上CD45⁺CR1⁺巨噬细胞数目增加,黑色素细胞形态异常,组织增厚及纤维化。在视网膜

与脉络膜交界处AMD的特点为RPE及Bruch's膜细胞中补体系统的激活及视网膜下腔小胶质细胞的聚集^[16-18]。

眼球有自身的内源性免疫系统,由小胶质细胞、树突状细胞及血管周围少量的巨噬细胞共同组成。同时RPE细胞亦具有不同的免疫功能,它们在维持视网膜生理功能动态平衡的过程中起着重要作用^[19]。在受损的Bruch's膜及脉络膜新生血管膜上发现巨噬细胞聚集在玻璃膜疣附近。RPE和血管内皮细胞中巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1(IL-1)等能促进细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达及其他炎症细胞的浸润,另外还可通过细胞因子诱导血管内皮细胞的增殖和迁移,从而加速血管新生和新生血管形成^[20]。小胶质细胞作为固有免疫系统中的吞噬细胞也参与到AMD的发病中。星芒状的神神经胶质细胞在胚胎发育早期进入内层视网膜^[21],被损伤或退化视网膜激活的小胶质细胞可运动至受损视网膜外层促进残余碎片的吞噬并产生多种促炎性细胞因子、趋化因子,形成一个具有神经毒性的微环境导致病情恶化。在AMD患者外层视网膜及视网膜下的区域均发现活化的小胶质细胞^[22]。

3 补体与 AMD

补体系统的激活在AMD发病中起着重要作用,在AMD患者的玻璃膜疣、RPE细胞及Bruch膜上已发现了C3a和C5a的沉积^[23]。AMD患者RPE细胞中脂褐质内的双维甲酸可激活补体系统^[24]。多种基因编码的补体蛋白及调节因子都与AMD有着密切联系,且在AMD发生的危险因子上表现出相对独立性及个体差异,这提示由于局部或系统性补体通路的差异尤其是旁路途径的差异使AMD具有个体易感性。由于补体种类繁多,各个补体因子与AMD的关系尚未完全明确。

3.1 补体 C3 补体C3可活化裂解为C3a和C3b,是三种补体途径的主要参与者。向视网膜下注射腺病毒载体将鼠眼置于C3环境中,发现其表现出多种AMD特征^[25]。在激光诱导的新生血管性AMD小鼠模型中发现局部的C3a水平升高,且手术切除的脉络膜新生血管(CNV)组织中发现C3a及其活化物C3c和C3d的沉积,提示C3在湿性AMD的发病中可能有重要作用。研究有CNV的AMD动物模型发现局部C3a水平升高,而对敲除C3基因小鼠模型的研究发现激光诱导的新生血管生长受阻^[26]。CNV的生长需要血管内皮生长因子(VEGF)刺激脉络膜血管内皮细胞,在体外C3a可促进RPE细胞分泌该因子,但人类脉络膜组织上尚未发现C3a的直接受体,这就提示C3a可能通过ICAM-1召集单核细胞聚集而间接作用于脉络膜^[27]。

许多研究证实AMD患者血浆中C3及其分解产物均增高且血浆C3水平与CFH,C2和免疫因子B的基因突变相关,但血浆C3的水平与AMD的定量关系尚不明确。已证实C3基因突变与AMD有密切关系^[28],如C3基因的Arg80Gly非同义突变致患AMD的人群归因危险度为22%^[29]。

3.2 补体 C4 补体C4可被活化的C3裂解成C4a和

C4b, C4a 在液相中可诱导肥大细胞释放组胺, 增加血管的通透性引起局部渗出性炎症, 但其活性低; C4b 参与经典激活途径中 C3 转化酶 (C4b2a) 和 C5 转化酶 (C4b2a3b) 的形成。AMD 患者血浆 C4 的水平与正常人无明显差异, 二者间的关系目前尚不明确^[30]。

3.3 补体 C5 补体 C5 可裂解为 C5a 和 C5b。C5a 是补体途径活化的标志, 在 AMD 患者血浆中的水平升高^[31]。玻璃膜疣中已发现 C5 和 C5a 的沉积。玻璃膜疣表面的 RPE 细胞对 C5a 和丙种球蛋白有免疫反应。研究敲除单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1/Ccl-2) 或 Ccl-2 受体 (Ccr-2) 的 AMD 小鼠模型发现该类小鼠出现巨噬细胞缺乏症状, 表现为 RPE 及脉络膜上 C5 和 IgG 聚集及清除功能受限。这些沉积的免疫复合物可诱导局部慢性炎症活动, 诱发 AMD^[32]。C5a 在 CNV 的形成中起着重要的作用, 体外培养的 RPE 细胞表面已发现 C5a 受体, C5a 刺激 RPE 细胞可增加 VEGF 分泌。同时, 刺激人脉络膜 C5a 受体可诱导 ICAM-1 的表达从而导致单核巨噬细胞的聚集^[33], 提示 C5a 可能间接促进局部炎症发生。

3.4 终端补体复合物 终端补体复合物由 C5b 结合血浆补体蛋白 C6, C7, C8, C9 组成。已在 AMD 患者的黄斑区及玻璃膜疣中发现该复合物的存在, 它可形成跨膜通道导致细胞的裂解和死亡。

3.5 补体因子 D 补体因子 D (CFD) 可增加补体旁路途径的活性, 将敲除 CFD 基因的小鼠暴露于每天 12h 恒光照射持续 10d 的环境中发现小鼠视网膜光感受器的破坏明显减少, 这提示抑制 CFD 或许可预防 AMD 的发生^[34]。

3.6 补体因子 H 补体因子 H (CFH) 多肽链由 20 个短同源重复序列 (SCR) 排列而成, 主要积聚在玻璃膜疣、RPE 细胞、RPE 层下方、光感受器内侧基膜及脉络膜, 在胚胎发育时期开始表达, 随年龄逐渐增多。体外培养的 RPE 细胞产生 CFH 蛋白的水平与局部微环境相关, r-干扰素可促进其产生而氧化应激刺激起抑制作用。CFH 蛋白是维持正常眼内灌注的重要调节因子也是补体旁路激活途径中主要的负性调控因子。Coffey 等研究敲除 CFH 基因的 2 岁小鼠模型发现该类鼠在解剖学、组织学及功能上均出现重要改变^[35], 包括自发荧光物质沉积, 视网膜神经层 C3 聚集, Bruch's 膜变薄, RPE 光感受器分布异常及感受器外节膜盘损伤, 且 C3 和 C3b 在视网膜血管内皮细胞内沉积会引起补体介导的血管内皮细胞的损害。

系统 CFH 水平与 AMD 的关系目前尚不明确。相关研究指出 CFH 的多态性与人体对 AMD 的敏感性有关, AMD 的患病危险程度归因于 CFH 基因中杂合子和纯合子的高危 C 等位基因, CFH 的 402 位氨基酸由酪氨酸转变为组氨酸的多态性是增加 AMD 患病风险的主要因素。在 SCR7 的 CFH402 位点组氨酸 (His) 代替酪氨酸 (Try) 可影响该位点与配体的结合, 降低与细胞亲和力, 从而使 C3 转化酶的旁路途径调节受损。另外 H402 与 CRP 的亲和力较 Y402 亦降低。Try-His 多态性位于 CFH 的 SCR7 中。SCR7 包含有肝素, C 反应蛋白和 M 蛋白的结合位点, 这些结合位点的等位基因特异性改变可能引起 H 因子抑制

补体相关性血管损伤的能力降低, 最终导致血管损伤, 出现渗出性病理改变^[36]。I62V 单核苷酸多态性 (SNP) 位于 CFH 基因的 SCR2 上, 参与 C3b 的结合, 在该位点由缬氨酸 (Val) 代替异亮氨酸 (Ile) 对 CFH 分子的折叠及热稳定性有重要影响^[37]。CFH V62 变异蛋白在与 C3b 结合、抑制 C3Bb 合成中的功能减退, 并在补体因子 I (CFI) 介导的 C3b 失活过程中降低辅助因子的功能。CFHL-1 是 CFH 基因产生的一种次要蛋白, 其功能与变异的 CFH Y402 相似, 能降低 CFH 与细胞的亲和力, 此外可能导致局部补体功能失调^[38]。

4 结论

AMD 是随年龄增长而出现的一种退行性疾病, 其中逐渐累积的氧化应激损伤是发病的主要诱因, 局部炎症、免疫系统的激活促进疾病的发展, 越来越多的证据表明慢性炎症及补体系统在 AMD 发病中起着重要的作用, 目前需进一步研究明确各种补体、炎症因子激活的诱导因子及在 AMD 发生发展中各种因子间的相互作用机制, 为进一步治疗寻找新的方法和措施。

参考文献

- Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):399-417
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128
- Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:52-60
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006;40(12):1250-1258
- Sugiura H, Ichinose M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide* 2011;25(2):138-144
- Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. *Br J Pharmacol* 2008;153(1):6-20
- Khandhadia S, Lotery A. Oxidation and age-related macular degeneration; insights from molecular biology. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e34
- Boulton M, Rózanowska M, Rózanowski B. Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B* 2001;64(2-3):144-161
- Jarrett SG, Lewin AS, Boulton ME. The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders. *Ophthalmic Res* 2010;44(3):179-190
- Gu X, Meer SG, Miyagi M, et al. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 2003;278(43):42027-42035
- Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, et al. Increased mitochondrial DNA damage and down-regulation of DNA repair enzymes in aged rodent retinal pigment epithelium and choroid. *Mol Vis* 2008;14(2):644-651
- Imamura Y, Noda S, Hashizume K, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(30):11282-11287
- Justilien V, Pang JJ, Renganathan K, et al. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4407-4420

- 14 Zhao Z, Chen Y, Wang J, *et al.* Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One* 2011;6(4):e19456
- 15 Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-435
- 16 Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(5): 348-368
- 17 Chen M, Forrester JV, Xu H. Dysregulation in retinal para-inflammation and age-related retinal degeneration in CCL2 or CCR2 deficient mice. *PLoS One* 2011;6(8):e22818
- 18 Campa C, Costagliola C, Incorvaia C, *et al.* Inflammatory mediators and angiogenic factors in choroidal neovascularization: pathogenetic interactions and therapeutic implications. *Mediators Inflamm* 2010;2010
- 19 Xu H, Dawson R, Forrester JV, *et al.* Identification of novel dendritic cell populations in normal mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(4):1701-1710
- 20 Apte RS. Regulation of angiogenesis by macrophages. *Adv Exp Med Biol* 2010;664:15-19
- 21 Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 2007;81(6):1345-1351
- 22 Gupta N, Brown KE, Milam AH. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2003;76(4):463-471
- 23 Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, *et al.* Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(7):2328-2333
- 24 Sparrow JR. Bisretinoids of RPE lipofuscin: trigger for complement activation in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 2010; 703:63-74
- 25 Lommatzsch A, Hermans P, Müller KD, *et al.* Are low inflammatory reactions involved in exudative age-related macular degeneration? Morphological and immunohistochemical analysis of AMD associated with basal deposits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246(6): 803-810
- 26 Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, *et al.* Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J Immunol* 2005;174(1):491-497
- 27 Skeie JM, Fingert JH, Russell SR, *et al.* Mullins complement component C5a activates ICAM-1 expression on human choroidal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(10):5336-5342
- 28 Thakkinstian A, McKay GJ, McEvoy M, *et al.* Systematic review and meta-analysis of the association between complement component 3 and age-related macular degeneration: a huge review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2011;173(12):1365-1379
- 29 Yates JR, Sepp T, Matharu BK, *et al.* Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2007; 357(6):553-561
- 30 Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, *et al.* Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* 2008; 3(7):e2593
- 31 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
- 32 Ambati J, Anand A, Fernandez S, *et al.* An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 2003;9(11):1390-1397
- 33 Skeie JM, Fingert JH, Russell SR, *et al.* Complement component C5a activates ICAM-1 expression on human choroidal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(10):5336-5342
- 34 Rohrer B, Guo Y, Kunchithapautham K, *et al.* Eliminating complement factor D reduces photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(11):5282-5289
- 35 Lundh von Leithner P, Kam JH, Bainbridge J, *et al.* Complement factor h is critical in the maintenance of retinal perfusion. *Am J Pathol* 2009;175(1):412-421
- 36 Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, *et al.* A common haplotype in the complement regulatory gene ' factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(20):7227-7232
- 37 Hocking HG, Herbert AP, Kavanagh D, *et al.* Structure of the N-terminal region of complement factor H and conformational implications of disease-linked sequence variations. *J Biol Chem* 2008;283(14):9475-9487
- 38 Skerka C, Lauer N, Weinberger AA, *et al.* Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration. *Mol Immunol* 2007;44(13):3398-3406