

脂褐素与年龄相关性黄斑变性

罗茂梅, 蔡善君

引用: 罗茂梅, 蔡善君. 脂褐素与年龄相关性黄斑变性. 国际眼科杂志 2019; 19(8): 1326-1329

基金项目: 国家自然科学基金(No.81760174)

作者单位: (563000) 中国贵州省遵义市, 遵义医科大学

作者简介: 罗茂梅, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 蔡善君, 毕业于四川大学, 博士, 主任医师, 教授, 副校长, 研究方向: 眼底病. caishanjuan@163.com

收稿日期: 2018-12-27 修回日期: 2019-07-05

摘要

年龄相关性黄斑变性(ARMD)是引起中老年人视力丧失的首要原因,其确切病因尚未明了,故治疗效果不佳。脂褐素随着年龄增长在视网膜色素上皮的积累是眼睛老化的标志,通过光化学作用等影响正常视网膜色素上皮细胞的功能,与ARMD的发生发展有一定联系。本文就脂褐素及其与ARMD的关系进行综述。

关键词: 脂褐素; N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺; 年龄相关性黄斑变性; 视网膜色素上皮; 氧化应激

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.8.14

Lipofuscin and age - related macular degeneration

Mao-Mei Luo, Shan-Jun Cai

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81760174)

Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Correspondence to: Shan - Jun Cai. Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China. caishanjuan@163.com

Received: 2018-12-27 Accepted: 2019-07-05

Abstract

• Age-related macular degeneration (ARMD) is a major cause resulting in visual loss of middle-aged and older people. The exact cause of this disease is unknown yet, and the curative effect is poor. The lipofuscin accumulation in retinal pigment epithelium with age is the marker of eye aging, which produces effect on the function of normal retinal pigment epithelial cells through photochemical action and others. It is associated with the occurrence and development of ARMD to some extent. Lipofuscin and its relation with ARMD are comprehensively introduced in this paper.

• **KEYWORDS:** lipofuscin; A2E; age - related macular degeneration; retinal pigment epithelium; oxidative stress

Citation: Luo MM, Cai SJ. Lipofuscin and age - related macular degeneration. *Guojì Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(8): 1326-1329

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)是发达国家55岁以上人群的主要致盲原因,其病因被认为是由多种因素引起的,包括持续氧化应激、慢性炎症、遗传和环境易感因素等^[1]。ARMD的患者数以百万计,并且可能随着人口寿命的延长而增加^[2]。ARMD能影响患者黄斑,导致中心视力丧失,严重影响患者的阅读、看电视或驾车的能力^[3]。大约90% ARMD患者病程缓慢进展,称为干性ARMD,特点是进行性色素上皮萎缩,然而该疾病可以转变为更严重的形式,称为湿性ARMD,特点是脉络膜新生血管,引起一系列出血、渗出和瘢痕改变,它是ARMD导致视力丧失的主要因素。导致ARMD发展以及从干性向湿性转变的机制尚不清楚,虽然这种疾病的治疗方案越来越多,但是目前还没有有效的治疗方法。脂褐素(有时称为“老化色素”)是细胞内的荧光色素颗粒,主要积聚在有丝分裂后细胞,如神经元细胞、心肌细胞和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞^[4]。脂褐素随着年龄增长而缓慢积累,一般来说它是氧化的蛋白质、脂质、碳水化合物、金属(主要是铁)和其他有机分子的混合物,但是这种混合物因来源的组织而异^[5]。脂褐素对细胞功能的作用目前还不清楚,但人们普遍认为,脂褐素的积累会增加机体对氧化应激的易感性,降低溶酶体的降解能力,RPE细胞中脂褐素随着年龄增长的聚积也被认为是ARMD的主要危险因素。

1 脂褐素的形成与组成

脂褐素随着年龄的增长而逐渐积累,是在多种病理生理条件下形成的,如氧化应激和老化,其基本特征是蛋白质损伤和清除之间的不平衡,导致蛋白质内稳态失调,氧化蛋白质聚集体积累,随后高交联材料如脂褐素和类脂褐素脂质体积聚,影响细胞活力^[6]。因此,脂褐素被看作是吞噬和自噬过程中未被消化的细胞物质的聚集体,作为内质颗粒堆积^[6]。在RPE中形成的脂褐素主要来源于RPE细胞吞噬光感受器外段脱落的膜盘,被吞噬的膜盘在溶酶体内未被完全消化,残留物便聚积形成脂褐素。正常人视网膜后极部脂褐素浓度最高,中央凹脂褐素含量最少,维持终身不变,这与视网膜的局部功能和视杆细胞分布是相对应的^[7]。在一位80岁患者的RPE细胞中脂褐素约占细胞体积的19%。导致脂褐素积累的增加可能与光照、RPE65以及基因突变致 ABCR 活性减低有关。光照会引起全反式视黄醛释放过多的脂褐素前体,而光感受器间的视黄醇结合蛋白可以在视杆外段清除全反式视黄醇和视黄醛,防止脂褐素前体的形成,但不能去除已经存在的前体。据报道,溶酶体酸化可以防止ARMD患者受损的RPE细胞堆积脂褐素^[8]; Hohn等^[9]认为自噬体和溶酶体并非强制性地参与脂褐素形成,而是充当此类生物分子聚集的储存场所,从而有助于减轻其细胞毒性; Ureshino

等^[10]发现细胞内脂褐素积累会损害巨噬细胞的自噬能力。最新研究表明脂褐素形成可以发生在溶酶体室外,并且独立于巨噬细胞吞噬过程,这是由于在衰老过程中有丝分裂和自噬普遍减少,但脂褐素的形成却仍然增加,线粒体裂变的抑制和线粒体蛋白质的持续氧化是年龄相关的脂褐素形成的重要因素^[11]。

从 RPE 脂褐素中分离出的第一个化合物是 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺(A2E),它是脂褐素的主要成分,属于类视黄醇家族,通过 NADPH 氧化酶催化产生超氧化物而具有毒性,导致 RPE 细胞死亡^[12]。A2E 具有特殊的楔型结构,由一个独特的吡啶极性头基团和两个疏水的维甲酸尾组成,因此不易被溶酶体酶识别难于被降解。A2E 的生物合成是一种多步骤过程:包括视锥和视杆细胞吸收光,产生全反式视黄醛,两分子全反式视黄醛与一分子乙醇胺反应形成 N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺(A2PE-H₂),然后 A2PE-H₂被氧化为 A2PE,它是 A2E 的直接前体,当光感受器脱落的膜盘被 RPE 细胞吞噬后,在溶酶体内酶切形成 A2E^[13]。视循环过程中产生过多的 11-顺式视黄醛也可在视杆细胞中直接形成 A2PE^[14]。由于光感受器外段的完全替换约 10d, A2PE 便不连续地积累在感光细胞,因此防止 A2PE 的积累有助于外段膜的不断更新。A2E 可被体外合成且已广泛用于研究,探讨其参与视网膜随着老化而发生的破坏性过程。A2E 大致分布规律在远周最高,向中心下降^[13]。

2 RPE 细胞脂褐素的自发荧光特性

RPE 细胞聚集的脂褐素是眼底自发荧光的来源,其成分复杂,含有 20 多个荧光团,主要是类视色素二聚体及其光氧化和光降解产物^[15]。在人视网膜组织切片中记录 RPE 脂褐素荧光,发现其信号从黄斑中央凹向周围增加,在距中心凹 8°处达到高峰后,向周边减少^[16]。眼底中央凹自发荧光少的主要原因黄斑色素对激发光的吸收和 RPE 中心有高密度的黑色素。脂褐素颗粒中荧光团的组成可随年龄或病理改变而变化,进而可导致眼底自发荧光光谱特征的改变^[17-18]。事实上,眼底自发荧光的光谱光度测量表明,65 岁时的荧光比 25 岁时的荧光强 2.8 倍,但自发荧光在 70 岁以后会下降,可能是由于 RPE 细胞随年龄减少,另一个促成因素可能是 A2E 光氧化相关的荧光下降。由于 RPE 脂褐素的自发荧光色素是由全反式视黄醛产生的,所以当 11 顺式和全反式视黄醛发色团不能通过视循环产生时,比如在与 RPE65 突变相关的早发性视网膜营养不良中,将不存在眼底自发荧光^[19-20]。此外,通过眼底荧光成像对 RPE 脂褐素的体内监测已经证明, RPE 显示出强烈自发荧光的区域容易萎缩,自发荧光增加的病灶区域是进展为 ARMD 的危险因素。眼底自发荧光激发光谱在 490~510nm(体内)和 590~630nm(体外)达到峰值^[21], RPE 脂褐素激发光谱在 590~600nm 达到峰值^[22]。眼底自体荧光的光谱特征与 RPE 脂褐素的光谱特征一致,当被逐渐变长的波长激发时,整个脂褐素记录的发射光谱显示出红移^[23]。有研究表明脂 A2E 在眼底自发总荧光强度中并不占优势, A2E 的氧化形式比 A2E 本身具有更强的荧光, A2E 对眼底自发总荧光强度的贡献不大^[18,23]。Tatiana 等发现在不同激发波长和发射波长下, A2E 和 iso-A2E 的荧光强度明显低于其他荧光团^[18]。

3 RPE 脂褐素引起 ARMD 的可能机制

3.1 RPE 脂褐素对细胞的影响 在体内,局部脂褐素含量

与邻近感光细胞的损伤直接相关,表现出对 RPE 细胞的毒性^[24]。超过一定浓度的 A2E 或脂褐素能破坏 RPE 的细胞膜、从线粒体分离促凋亡蛋白、损害溶酶体功能(抑制溶酶体质子泵、碱化溶酶体并增加溶酶体内胆固醇含量而抑制吞噬功能)等,造成 RPE 损伤^[25],这些可能与 A2E 的特殊结构有关, A2E 的两亲性结构导致其能聚集、诱导洗涤剂样膜完整性丧失、溶解单层膜的脂质双层并引发膜泡起泡。而 Cheng 等^[26]发现 A2E 在破坏线粒体膜方面特有效,可能是由于带负电荷的线粒体膜和带正电荷的 A2E 分子之间有很好的相互作用。Wang 等^[27]认为 A2E 的光氧化会引起 DNA 损伤,包括端粒去保护作用,进一步加速 RPE 细胞的衰老,并导致旁分泌效应,影响整个视网膜环境,从而可能导致视网膜变性。脂褐素还被证明可与氧化还原活性的金属比如铁结合,产生活性氧,诱导细胞凋亡,脂褐素导致细胞损伤和细胞毒性的程度似乎与脂褐素本身存在的铁浓度密切相关^[11,28]。Parmar 等^[29]利用诱导多能干细胞来源的 RPE 细胞与 10μmol/L 的 A2E 共培养,发现与时间成正比的细胞死亡数的增多,并出现血管内皮生长因子上调和 26 种前体炎性因子上调,促进脉络膜新生血管的形成,引起视网膜炎症,导致 RPE 细胞损伤。一些研究表明, A2E 本身并不会引起 RPE 细胞死亡,反而可刺激 RPE 细胞自噬,防止损伤细胞的积累^[30-31],自噬在保护 RPE 免受氧化应激和脂褐素积累中起着重要作用,但当自噬能力随着脂褐素积累的增加而下降时,可加速 ROS 生成和蛋白聚集,激活炎症反应,进一步诱发 RPE 长期的炎症、加速老化过程、细胞变性,最终可导致细胞死亡^[32]。脂褐素还有一个重要特征是它能通过竞争性结合蛋白水解酶抑制氧化蛋白降解,包括 20S 蛋白酶体和溶酶体蛋白酶,导致脂褐素的进一步积累,增强它的细胞毒性^[6]。

3.2 RPE 脂褐素的光氧化 随着年龄的增长, RPE 细胞中光氧化和光降解产物水平的增加尤其可能增加 ARMD 的风险。Zareba 等^[33]发现原代培养人 RPE 细胞的光损伤程度与其内源性脂褐素含量成正比。Kim 等在分离的人和小鼠视网膜色素上皮中检测到 A2E 和全反式视黄醛二聚体的光氧化形式,提出光氧化在眼睛中是一个持续的过程^[24]。对 RPE 脂褐素和单个脂褐素荧光团(如全反式视黄醛二聚体和 A2E)的研究表明,这些化合物是单线态氧和超氧化物阴离子等活性氧的光诱导发生器^[34-35]。用蓝光对人 RPE 分离的脂褐素颗粒进行有氧光活化,可产生单线态氧、超氧阴离子和过氧化氢等大量氧自由基^[36],引发细胞膜功能异常、溶酶体和抗氧化酶失活,尤其是 A2E 在蓝光激发下形成有害的 A2E-环氧化物能加速活性氧产生,引发 RPE 细胞损伤^[34]。RPE 脂褐素的光毒性在体外研究中也得到证实,在人 RPE 细胞培养基中预载脂褐素颗粒,暴露于 390~550nm 光下,脂褐素光敏细胞表现出明显的形态学改变,溶酶体完整性丧失,脂质过氧化增强,存活率显著降低^[37]。Magdalena 等首次证实人 RPE 脂褐素颗粒诱导的光氧化会损伤 RPE 细胞的特异性吞噬活性,抗氧化剂具有中和脂褐素产生活性氧的作用^[38],证实了活性氧以及氧化应激在 ARMD 发生过程中的重要性。

A2E 和全反式视黄醛二聚体光氧化后能刺激补体激活^[39],还可导致 Abca4 突变小鼠的 Bruch 膜增厚和光感受器细胞变性^[40]。Yamamoto 等^[41]观察到灵长类动物体内 RPE 脂褐素荧光下降,这可能是由于脂褐素有光氧化和光降解的倾向。在任何给定时间,眼底自发荧光的强度可

能是荧光团合成与 RPE 中脂褐素光氧化/光降解不同步的结果。在视网膜血管的阴影下,由视黄醛(11-顺式转换为全反式视黄醛)形成的脂褐素可继续有增无减,但脂褐素光氧化将显著减少^[14,42],因此视网膜易位比如视网膜脱离时会显示出更强烈的自体荧光的血管印记。

3.3 其他 脂褐素色素的积累是正常 RPE 的特征,但是在 Abca4 基因突变相关的视网膜疾病(比如隐性 Stargardt 病)中特别丰富,20~29 岁的 Stargardt 患者的自发荧光强度甚至比 60~69 岁的正常人高 2 倍,Abca4 中某些突变的致病杂合体也表现出对 ARMD 的易感性增加^[43]。RPE 脂褐素的光氧化产物还可激活补体,引起慢性炎症过程,逐渐使黄斑患病,因此补体激活未被充分调节也被认为是与 ARMD 易感性的基础^[44]。此外,视网膜下小胶质细胞中脂褐素随年龄增加而积累,能促进炎症和补体激活与沉积,进而驱动 ARMD 病理过程中视网膜外免疫失调^[45]。载脂蛋白 B 随年龄增长沉积在 Bruch 膜中形成脂质壁,与上述产生的活性氧作用产生炎症过氧化脂质,引发新生血管,从而参与玻璃膜疣的形成,玻璃膜疣是 ARMD 特有的富含脂质的细胞外病变。

4 小结

虽然 RPE 脂褐素是引发 ARMD 的主要因素这一观点尚未得到证实,但脂褐素参与 ARMD 病因学的证据不容忽视,越来越多的迹象表明 RPE 脂褐素过度积累可导致细胞功能障碍,并导致视网膜老化和退化。因此我们应努力了解 ARMD 发生发展过程中 RPE 脂褐素所起的作用,以及与其他因素之间的可能联系,从而为 ARMD 的预防与治疗提供巨大帮助。

参考文献

- 1 Khandhadia S, Lotery A. Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Rev Mol Med* 2010; 12:e34
- 2 Pennington KL, DeAngelis MM. Epidemiology of age-related macular degeneration (ARMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis (Lond)* 2016;3:34
- 3 Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):399-417
- 4 Skoczynska A, Budzisz E, Trznadel-Grodzka E, et al. Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging. *Postep Derm Alergol* 2017;34(2):97-103
- 5 Terman A, Brunk UT. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(8):1400-1404
- 6 Hohn A, Grune T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 2013;1:140-144
- 7 Ach T, Huisingh C, McGwin G Jr, et al. Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(8):4832-4841
- 8 Guha S, Liu J, Baltazar G, et al. Rescue of compromised lysosomes enhances degradation of photoreceptor outer segments and reduces lipofuscin-like autofluorescence in retinal pigmented epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 2014;801:105-111
- 9 Hohn A, Sittig A, Jung T, et al. Lipofuscin is formed independently of macroautophagy and lysosomal activity in stress-induced prematurely senescent human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2012;53(9):1760-1769
- 10 Ureshino RP, Rocha KK, Lopes GS, et al. Calcium signaling alterations, oxidative stress, and autophagy in aging. *Antioxid Redox Signal* 2014;21(1):123-137
- 11 Konig J, Ott C, Hugo M, et al. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol* 2017;11:673-681

- 12 Palczewska G, Maeda T, Imanishi Y, et al. Noninvasive multiphoton fluorescence microscopy resolves retinol and retinal condensation products in mouse eyes. *Nat Med* 2010;16(12):1444-1449
- 13 Crouch RK, Koutalos Y, Kono M, et al. A2E and Lipofuscin. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;134:449-463
- 14 Boyer NP, Higbee D, Currin MB, et al. Lipofuscin and N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure; their origin is 11-cis-retinal. *J Biol Chem* 2012;287(26):22276-22286
- 15 Sparrow JR, Wu Y, Kim CY, et al. Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. *J Lipid Res* 2010;51(2):247-261
- 16 Sparrow JR, Duncker T. Fundus Autofluorescence and RPE Lipofuscin in Age-Related Macular Degeneration. *J Clin Med* 2014;3(4):1302-1321
- 17 Feldman TB, Yakovleva MA, Dontsov AE, et al. Fluorescence emission and excitation spectra of fluorophores of lipofuscin granules isolated from retinal pigment epithelium of human cadaver eyes. *Russian Chemical Bulletin* 2010;59(1):276-283
- 18 Feldman TB, Yakovleva MA, Arbukhanova PM, et al. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human-retinal-pigment epithelium with age and pathology. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(4):1075-1088
- 20 Lorenz B, Wabbels B, Wegscheider E, et al. Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. *Ophthalmology* 2004;111(8):1585-1594
- 21 Delori FC. Autofluorescence method to measure macular pigment optical densities fluorometry and autofluorescence imaging. *Arch Biochem Biophys* 2004;430(2):156-162
- 22 Sparrow JR, Gregory-Roberts E, Yamamoto K, et al. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2012;31(2):121-135
- 23 Sparrow JR, Wu Y, Nagasaki T, et al. Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9(11):1480-1489
- 24 Yoon KD, Yamamoto K, Ueda K, et al. A novel source of methylglyoxal and glyoxal in retina: implications for age-related macular degeneration. *PLoS One* 2012;7(7):e41309
- 25 Shamsi FA, Boulton M. Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(12):3041-3046
- 26 Cheng YS, Linetsky M, Gu X, et al. Light-induced generation and toxicity of docosahexaenoate-derived oxidation products in retinal pigmented epithelial cells. *Exp Eye Res* 2018;18:30292-30296
- 27 Wang J, Feng Y, Han P, et al. Photosensitization of A2E triggers telomere dysfunction and accelerates retinal pigment epithelium senescence. *Cell Death Dis* 2018;9(2):178
- 28 Hohn A, Jung T, Grimm S, et al. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. *Free Radic Biol Med* 2010;48(8):1100-1108
- 29 Parmar VM, Parmar T, Arai E, et al. A2E-associated cell death and inflammation in retinal pigmented epithelial cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2018;27:95-104
- 30 Saadat KA, Murakami Y, Tan X, et al. Inhibition of autophagy induces retinal pigment epithelial cell damage by the lipofuscin fluorophore A2E. *FEBS Open Bio* 2014;4:1007-1014
- 31 Zhang J, Bai Y, Huang L, et al. Protective effect of autophagy on human retinal pigment epithelial cells against lipofuscin fluorophore A2E: implications for age-related macular degeneration. *Cell Death Dis* 2015;6:e1972
- 32 Salminen AKK, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* 2012;4(3):166-175
- 33 Zareba M, Skumatz CM, Sarna TJ, et al. Photic injury to cultured

RPE varies among individual cells in proportion to their endogenous lipofuscin content as modulated by their melanosome content. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(8):4982-4990

34 Nita M, Grzybowski A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:3164734

35 Wang Y, Kim HJ, Sparrow JR. Quercetin and cyanidin-3-glucoside protect against photooxidation and photodegradation of A2E in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2017;160:45-55

36 Feng J, Chen X, Sun X, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP induced by oxidative stress in blue light-mediated damage of A2E-containing retinal pigment epithelium cells. *Ophthalmic Res* 2014;52(4):224-233

37 Davies S, Elliott MH, Floor E, et al. Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31(2):256-265

38 Olchawa MM, Furso JA, Szweczyk GM, et al. Lipofuscin-mediated photic stress inhibits phagocytic activity of ARPE-19 cells; effect of donors' age and antioxidants. *Free Radic Res* 2017;51(9-10):799-811

39 Jun K, Hong LJ, Dae SJ, et al. Quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside protects against retinal cell death via blue light-induced damage in human RPE cells and Balb-c mice. *Food Funct*

2018;9(4):2171-2183

40 Radu RA, Hu J, Yuan Q, et al. Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of a mouse model for Stargardt macular degeneration. *J Biol Chem* 2011;286(21):18593-18601

41 Yamamoto K, Zhou J, Hunter JJ, et al. Toward an understanding of bisretinoid autofluorescence bleaching and recovery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(7):3536-3544

42 Quazi F, Molday RS. ATP-binding cassette transporter ABCA4 and chemical isomerization protect photoreceptor cells from the toxic accumulation of excess 11-cis-retinal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(13):5024-5029

43 Zhang R, Wang LY, Wang YF, et al. Associations of the G1961E and D2177N variants in ABCA4 and the risk of age-related macular degeneration. *Gene* 2015;567(1):51-57

44 Brandstetter C, Holz FG, Krohne TU, et al. Complement Component C5a Primes Retinal Pigment Epithelial Cells for Inflammasome Activation by Lipofuscin-mediated Photooxidative Damage. *J Biol Chem* 2015;290(52):31189-31198

45 Ma W, Coon S, Zhao L, et al. A2E accumulation influences retinal microglial activation and complement regulation. *Neurobiol Aging* 2013;34(3):943-960