

【文献综述】

庄森 综述 姚勇 审校

[眼科新进展,2014,34(10):993-996]

人类 TNF 基因定位于 6p21.4, 长约 3.6 kbp, 有 4 个外显子和 3 个内含子, 与主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 基因紧密连

2 TNF 与 DR 的关联性分析

2.1 TNF 的概念 TNF 于 19 世纪末被人们所发现,1984 年首次被克隆。1985 年 Shalaby 等^[5]把巨噬细胞产生的 TNF 命名为 TNF- α ,把 T 淋巴细胞产生的淋巴毒素 (lymphotoxin,LT) 命名为 TNF- β 。

TNF- α 是一种单核因子,主要由激活的单核细胞和巨噬细胞产生,TNF- α 具有双重的生物学作用。正常水平的 TNF- α 可以调节免疫应答、抗感染、促进组织修复、引起肿瘤细胞凋亡等,但大量产生和释放则会破坏机体的免疫平衡,与其他炎症因子一起产生多种病理损伤^[6]。

TNF- β 是最早发现的细胞因子之一,LT 是淋巴细胞受抗原或有丝分裂原等刺激活化后或在某些肿瘤、自身免疫疾病的情况下分泌产生的一种细胞因子。LT 与 TNF- α 在分子结构和活性区域上相似。但其有抗肿瘤、抗病毒等生物学活性和潜在的药用价值,以及毒副作用低于 TNF- α 而引起关注。

2.2 TNF 在全身的表达 早在 1998 年,Winkler 等^[7]通过对 T2DM 患者、肥胖者及正常人这三组研究对象的血清 TNF- α 的浓度及生物活性进行测定,发现 T2DM 患者与肥胖者血清 TNF- α 浓度和生物活性均较正常人高。之后又有众多学者对不同地区的 DR 患者组与正常对照组的血清 TNF- α 浓度进行了测定,均发现 DR 患者血清 TNF- α 浓度较正常人高^[8-9]。且进一步研究发现,血浆 TNF- α 浓度在正常对照组、糖尿病非视网膜病变患者组、非增生性 DR 患者组以及增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者组之间有递增的趋势^[10-12]。Arita 等^[13]发现 DR 患者血清中膜性 TNF- α 、可溶性 TNF- α 以及它们的受体均较对照组显著升高。Zorena 等^[14]对患有 1 型糖尿病的儿童及成人进行研究,发现当 TNF- α 血浆浓度超过 $1.7 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,会增加糖尿病微血管病变发生的可能性。Roy 等^[15]对非裔美国人 1 型糖尿病患者 28 种血清炎症生物指标进行测定比较,发现 TNF- α 与 PDR 的发生与发展均有密切关系。另外,当 TNF- α 基线大于 $3.4 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,PDR 发生的危险性会增加 3~4 倍。

2.3 TNF 在局部的表达 2011 年,Koskela 等^[16]通过研究发现,PDR 患者血浆中 IL-6、IL-8 浓度低于玻璃体内,说明眼内的炎症因子高于全身。而同样作为重要的炎症因子,TNF 是否也是如此呢?张洁等^[17]通过研究发现,DR 患者泪液中 TNF- α 水平增高,且其浓度在非糖尿病对照组、无 DR 的糖尿病患者组及 DR 患者组之间存在递增关系。Zhou 等^[18]对 PDR 组和对照组比较发现,PDR 组 TNF 在眼内的浓度明显较对照组高,而且他们还发现,PDR 患者眼内 TNF 水平与血浆 HBA1C 水平密切相关。然而,Gustavsson 等^[19]的研究并未发现眼内 TNF- α 水平的

升高。Adamiec-mroczek 等^[20]通过研究发现 PDR 患者组玻璃体和血浆 TNF- α 浓度与对照组之间无统计学差异。综上所述,TNF- α 在 DR 患者眼内表达水平可能存在地区、种族差异,导致结论不同,也有可能是样本量过小所致。TNF- α 在 DR 患者眼内表达是否增加有待大样本、多种族、多地区的研究来验证。

2.4 TNF 在 DR 中的作用机制

2.4.1 血-视网膜屏障受损 在糖尿病患者中,高糖环境持续刺激机体,使机体代谢发生异常,视网膜毛细血管正常的结构和功能被破坏。这不仅造成了视网膜的损害,亦使之长期处于缺血、缺氧状态。这种缺氧刺激打破了视网膜血管生长因子和抑制因子间的平衡,使 TNF- α 分泌增加。TNF- α 广泛分布于血管内皮细胞和视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial,RPE) 细胞表面,它通过打开视网膜血管内皮细胞和 RPE 细胞的紧密连接而致血-视网膜屏障破坏,进而使血管渗透性增加,而后者是使 DR 从非增殖期向增殖期转变的重要因素。Shirasawa 等^[21]对体外培养的 RPE 细胞予以不同浓度的 TNF- α 处理,以细胞跨上皮电阻作为评价指标进行研究,他们认为 TNF- α 破坏血-视网膜屏障可能是通过 p38 MAPK 途径实现的。

2.4.2 引起视网膜新生血管 TNF- α 存在于 PDR 患者纤维血管膜浸润细胞、视网膜血管内皮细胞及细胞外基质中,是体外培养 RPE 细胞最强的有丝分裂原之一。TNF- α 含量增加可以导致视网膜血管通透性增高,导致血清蛋白持续渗漏。另外,它还能通过激活促凝血酶原,抑制抗凝血蛋白 C 旁路及合成纤溶激活剂抑制物,刺激血小板和内皮细胞释放血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 样有丝分裂原,引起基质过量产生和血管内皮细胞增生,最终导致眼内新生血管形成,促进 PDR 的发生。

2.4.3 诱导细胞凋亡 TNF- α 与其受体结合后具有直接杀伤细胞、诱导神经元凋亡的作用。此外,它还可以通过其他生长因子如 IGF-1 和胰岛素受体等直接侵入细胞内而导致细胞凋亡。

Jiang 等^[22]在体外培养了视网膜内皮细胞,并对正常环境和高糖环境下的细胞予以 TNF- α 处理,通过比较,认为 TNF- α 通过调节胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 使视网膜内皮细胞凋亡,这一过程通过两种途径实现:一是 TNF- α 能增加胰岛素受体底物-1 丝氨酸 307 (IRS-1Ser307) 的磷酸化;二是 TNF- α 能增加细胞因子信号途径抑制物 3 (suppressor of cytokine signaling-3, SOCS3) 水平,进而使总 IRS-1 减少,胰岛素受体酪氨酸 960 (IRTyr960) 增加。这两种途径都阻断了正常的胰岛素信号转导,从而达到诱导细胞凋亡的目的。

2.4.4 诱导炎症反应 在 DR 的发生与发展中,炎症因子的参与具有重要作用。TNF- α 属于炎症前细

胞因子。DR 是一种慢性长过程炎症反应,在病变起始阶段,炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-1 等,可促使血管内皮细胞表达黏附分子异常,增多的细胞因子使小胶质细胞活化,从而刺激炎症循环而使白细胞增加、黏附、聚集、移行,同时释放细胞毒性物质如自由基及蛋白水解酶,导致血管通透性改变及内皮细胞损伤,以致血管破坏,终致微血栓形成。

2.4.5 作用于血小板 TNF- α 可诱导血小板释放血管活性分子并刺激血小板和内皮细胞释放 PDGF 样有丝分裂原,并刺激表达细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1),促使白细胞与内皮细胞的黏附、聚集。研究发现,PDR 患者血清中血小板表达 TNF- α 、TNF-R 及 ICAM-1 水平升高,说明 TNF- α 可作为糖尿病微血管并发症病程发展中血小板异常的重要标志。

2.4.6 激活小胶质细胞 有许多证据表明细胞因子在对小胶质细胞的活化中起作用,细胞因子如 TNF、IL-1B、IL-6 等都有直接激活小胶质细胞的作用。TNF 可降低小胶质细胞中 cAMP 水平,进而直接激活小胶质细胞。活化的小胶质细胞进一步释放前炎症细胞因子及趋化因子,参与 DR 病变的代谢反应及炎症反应。

3 TNF 基因与 DR 的关联性分析

3.1 TNF 基因 SNP 的相关研究 随着 TNF 水平升高在疾病中的意义越来越受到重视,TNF 基因的重要性不言而喻。TNF 在 DR 患者血液中的浓度明显较对照组高,也不难联想到调控 TNF 的基因是否与 DR 的发生发展有一定的关联。-308(rs1800629)位点位于 TNF- α 基因的启动子区,其多态性被认为与 TNF- α 的水平相关,-238(G-A)为在启动子区域转录起始位点上游第 238 位点的碱基 G 被碱基 A 代替了,这一位点突变造成了限制性内切酶 MspI 的识别位点的缺失,使被 A 替代的核苷酸序列不能被 MspI 识别并切断,即出现限制性片段长度多态性。这两个位点是近年来对 TNF 和 DR 相关性分析的主要切入点。Paine 等^[23]通过对 493 名志愿者(253 例 PDR 患者及 240 例单纯糖尿病患者)的研究中观察到,-238A 在 PDR 患者组中出现的频率明显比对照组高,并认为-238A 是 PDR 发病的潜在危险因素。Lindholm 等^[24]的研究数据表明 LTA C60N C-A 碱基变换、AGER-374 T-A 碱基变换、TNF-308 G-A 碱基变换与糖尿病微血管并发症(包括 DR)有关。Wang 等^[25]考察 rs1800629、rs1041981、rs2857713 三个 TNF 相关基因,认为均与 DR 无关,Yoshioka 等^[26]对 251 例日本 2 型糖尿病患者进行的研究也显示,LTA 的 804C-A 碱基变换、252A-G 碱基变换以及 TNF- α -308G-A 碱基变换与 DR 无关。

3.2 TNF 基因微卫星多态性的相关研究 Hawrami 等^[27]基于对南印度人群的研究发现,TNF- α 微卫星

多态性中,B9(112bp)在增生性 DR 和无视网膜病变者中的出现频率有显著差异($P=0.04$)。Kumaramanickavel 等^[28]基于对印度人群的研究发现,B4 在糖尿病非视网膜病变患者组和 DR 患者组间有显著差异($P=0.002$),他们还将研究群体细分为南印度、北印度两组,差异依旧显著(北印度 $P=0.003$,南印度 $P=0.008$),因此他们认为 B4(103 bp)是视网膜病变发展的低危因素;另外他们还发现 B8 和 PDR 有密切关系。Uthra 等^[29]通过对南印度人群的研究发现,(GT)15(即 B10)是 DR 的危险因素之一。

4 展望

TNF- α 是一种重要的前炎症因子,它有免疫应答、引起肿瘤细胞凋亡等重要作用^[30],在糖尿病患者眼内,它能通过破坏血-视网膜屏障、促进新生血管形成、诱导内皮细胞凋亡等途径,破坏正常的视功能,从而促进 DR 的发展。然而,TNF 与 DR 之间尚有众多疑问有待解决。从发病角度来看,DR 是一种多基因相关的病变,TNF 作为众多细胞因子之一,它与其他细胞因子对 DR 的发生发展是否存在协同作用,甚至互相依赖作用,仍有待大量研究进行考证。从治疗角度看,TNF 虽然在破坏视网膜细胞正常功能方面的作用已被证实,但是 TNF 抑制剂却很难只对眼内病变起作用而不引起全身反应,药物的剂量、剂型等依旧有待商榷。尽管如此,随着近几年对 TNF 作用与 DR 机制相关研究的深入,还是为临床治疗提供了不少新的思路。杨萍等^[31]利用辛伐他汀对早期 DR 患者进行抗炎治疗,以 TNF 及视网膜改变作为评价依据,发现辛伐他汀可以降低患者血循环中炎症因子的水平,这可能是其改善 DR 的机制之一。

总之,TNF 表达异常与其基因多态性有关。近几年,对 TNF 基因多态性的研究较多,然而结果却并不一致,这可能与种族差异、地区差异等环境因素有关。所以要完善 TNF 基因多态性与 DR 相关性的研究,还需要大样本、多种族、多地区的相关研究来证实,从而进一步指导未来的个体化基因治疗。

参考文献

- 1 Zheng Y, He M, Congdon N. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2012, 60(5): 428-431.
- 2 Liu L, Liu LM, Hu YD, Chen K, Feng H, Sun YZ, et al. Epidemic studies of diabetic retinopathy in China-a review[J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(6): 670-672.
- 3 Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group; Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(3): 556-564.
- 4 Ding J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema[J]. *Curr Diab Rep*, 2012, 12(4): 346-354.
- 5 Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino M. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors[J]. *J Immunol*, 1985, 135(3): 2069-2073.

- 6 胡安娜,刘春梅,杜自强,王利利,周欣,武怡,等. 急性病毒性心肌炎小鼠肿瘤坏死因子- α 、单核细胞趋化蛋白-1 的表达及卡维地洛的干预作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28 (13): 1020-1022.
- 7 Winkler G, Salamon F, Harmos G, Salamon D, Speer G, Szekeres O, *et al.* Elevated serum tumor necrosis factor- α concentrations and bioactivity in type 2 diabetics and patients with android type obesity [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1998, 42 (3): 169-174.
- 8 李昕,郑曰忠. 糖尿病视网膜病变患者血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-2 和细胞间粘附分子-1 水平检测意义[J]. 中国实用眼科杂志, 2013, 31 (2): 111-114.
- 9 田林红,张明,张宏刚,罗晖,张文博,倪安民. 糖尿病视网膜病变肿瘤坏死因子- α 水平测定及临床意义[J]. 中国实用眼科杂志, 2009, 27 (2): 114-116.
- 10 孟宪民,庞婉燕. 血清中血管内皮生长因子、白细胞介素-2 及肿瘤坏死因子 α 在糖尿病视网膜病变中的作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29 (9): 839-842.
- 11 周云科,陈蕾,许礼华. 2 型糖尿病视网膜病变的相关性研究[J]. 实用糖尿病杂志, 2013, 9 (2): 50-51.
- 12 苏宪,刘俊茹,张志红,耿绍辉,臧旭峰. 白介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 在糖尿病视网膜病变患者血清中的表达及意义[J]. 河北医药, 2012, 34 (13): 2009-2010.
- 13 Arita R, Nakao S, Kita T, Kawahara S, Asato R, Yoshida S, *et al.* A key role for ROCK in TNF- α -mediated diabetic microvascular damage[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (3): 2373-2383.
- 14 Zorena K, Kula M, Malinowska E, Raczynska D, Mysliwiec M, Raczynska K, *et al.* Threshold serum concentrations of tumour necrosis factor alpha (TNF α) as a potential marker of the presence of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM) [J]. *Hum Immunol*, 2013, 74 (1): 75-81.
- 15 Roy MS, Janal MN, Crosby J, Donnelly R. Inflammatory biomarkers and progression of diabetic retinopathy in African Americans with type 1 diabetes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (8): 5471-5480.
- 16 Koskela UE, Kuusisto SM, Nissinen AE, Savolainen MJ, Liinamaa MJ. High vitreous concentration of IL-6 and IL-8, but not of adhesion molecules in relation to plasma concentrations in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Ophthalmic Res*, 2013, 49 (2): 108-114.
- 17 张洁,王伟超,李雅婷,张庆玉,张战军. 2 型糖尿病患者泪液肿瘤坏死因子- α 的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22 (31): 73-75.
- 18 Zhou J, Wang S, Xia X. Role of intravitreal inflammatory cytokines and angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37 (5): 416-420.
- 19 Gustavsson C, Agardh CD, Agardh E. Profile of intraocular tumour necrosis factor- α and interleukin-6 in diabetic subjects with different degrees of diabetic retinopathy[J]. *Acta Ophthalmol*, 2013, 91 (3): 445-452.
- 20 Adamiec-mroczek J, Oficjalska-mlyńczak J, Misiuk-hojlo M. Roles of endothelin-1 and selected proinflammatory cytokines in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy: Analysis of vitreous samples[J]. *Cytokine*, 2010, 49 (3): 269-274.
- 21 Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, Arimura N, Otsuka H, Yamashita T, *et al.* TNF- α disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 110 (1): 59-69.
- 22 Jiang Y, Zhang Q, Soderland C, Steinle JJ. TNF α and SOCS3 regulate IRS-1 to increase retinal endothelial cell apoptosis[J]. *Cell Signal*, 2012, 24 (5): 1086-1092.
- 23 Paine SK, Sen A, Choudhuri S, Mondal LK, Chowdhury IH, Basu A, *et al.* Association of tumor necrosis factor α , interleukin 6, and interleukin 10 promoter polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic subjects[J]. *Retina*, 2012, 32 (6): 1197-1203.
- 24 Lindholm E, Bakhtadze E, Cilio C, Agardh E, Groop L, Agardh CD. Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications [J]. *PLoS One*, 2008, 3 (6): e2546.
- 25 Wang N, Huang K, Zou H, Shi Y, Zhu J, Tang W, *et al.* No association found between the promoter variants of TNF- α and diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes[J]. *Curr Eye Res*, 2008, 33 (4): 377-383.
- 26 Yoshioka K, Yoshida T, Takakura Y, Umekawa T, Kogure A, Toda H, *et al.* Relationship between polymorphisms 804C/A and 252A/G of lymphotoxin- α gene and 308G/A of tumor necrosis factor α gene and diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Metabolism*, 2006, 55 (10): 1406-1410.
- 27 Hawrami K, Hitman GA, Rema M, Snehalatha C, Viswanathan M, Ramachandran A, *et al.* An association in non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects between susceptibility to retinopathy and tumor necrosis factor polymorphism[J]. *Hum Immunol*, 1996, 46 (1): 49-54.
- 28 Kumaramanickavel G, Sriprya S, Vellanki RN, Upadhyay NK, Badrinath SS, Arokiasamy T, *et al.* Tumor necrosis factor allelic polymorphism with diabetic retinopathy in India [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2001, 54 (2): 89-94.
- 29 Uthra S, Raman R, Mukesh BN, Rajkumar S, Kumari P, Lakshminipathy P, *et al.* Diabetic retinopathy: Validation study of ALR2, RAGE, iNOS and TNFB gene variants in a south Indian cohort [J]. *Ophthalmic Genet*, 2010, 31 (4): 244-251.
- 30 宿建丽,王静. 2 型糖尿病患者血清肿瘤坏死因子- α 、瘦素和可溶性血管内皮细胞黏附因子 1 水平与心脑血管并发症的相关性[J]. 新乡医学院学报, 2013, 30 (4): 292-294.
- 31 杨萍,孙书明,李晓鹏. 辛伐他汀对糖尿病视网膜病变和炎症因子的影响[J]. 眼科新进展, 2013, 33 (8): 754-756.