

CCR3 在湿性年龄相关性黄斑变性中的研究进展

吴宪巍¹, 刘哲丽²

作者单位:¹(117000) 中国辽宁省本溪市中心医院眼科;
²(110000) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 吴宪巍, 男, 眼科学博士, 副主任医师, 师从刘哲丽教授, 研究方向: 眼底疾病。

通讯作者: 吴宪巍. wxw04@163.com

收稿日期: 2013-11-07 修回日期: 2014-02-13

Study progress of CCR3 in wet age-related macular degeneration

Xian-Wei Wu¹, Zhe-Li Liu²

¹Department of Ophthalmology, Benxi Central Hospital, Benxi 117000, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xian-Wei Wu. Department of Ophthalmology, Benxi Central Hospital, Benxi 117000, Liaoning Province, China. wxw04@163.com

Received: 2013-11-07 Accepted: 2014-02-13

Abstract

• According to the study, chemokine receptor 3 (CCR3) in the eye is mainly distributed in retinal pigment epithelial cells, and also expressed in the choroidal vascular endothelial cells (CECs). The specificity of CCR3's high expression in wet age-related macular degeneration (AMD) was found, and it is proved that in wet-AMD patients, it plays an important role in the formation of choroidal neovascularization (CNV). In this paper, the structure, function, the problem of current research and the future direction of CCR3 were summarized. It is believed that with the further research on CCR3, it will not only help us to find a new method of wet-AMD diagnosis and treatment, but also may provide an important reference for other CNV disease research and new anti-CNV drugs.

• **KEYWORDS:** wet age-related macular degeneration; receptor; chemokine receptor 3

Citation: Wu XW, Liu ZL. Study progress of CCR3 in wet age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):457-459

摘要

研究显示, 趋化因子受体 3 (chemokine receptor 3, CCR3) 在眼部主要分布于视网膜色素上皮细胞中, 亦表达于脉络膜血管内皮细胞 (CECs) 中。CCR3 的特异性高表达在湿性年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 中被发现, 并被证明在湿性 AMD 患者脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 的产生中具有重要作用。本文拟对 CCR3 的结构、功能、目前

研究存在的问题及未来的研究方向做一综述。相信随着对 CCR3 研究的进一步深入, 必将帮助我们寻找到一种湿性 AMD 诊断和治疗的新方法, 同时也可能对其它 CNV 性疾病研究以及新的抗 CNV 药物提供重要参考。

关键词: 湿性年龄相关性黄斑变性; 受体; 趋化因子受体 3
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.20

引用: 吴宪巍, 刘哲丽. CCR3 在湿性年龄相关性黄斑变性中的研究进展. *国际眼科杂志* 2014;14(3):457-459

0 引言

随着人类预期寿命的提高, 对于年龄相关性疾病特别是年龄相关性黄斑变性的诊治变得越来越重要。目前, 世界上大于 60 岁的人口约有 6 亿, 而到了 2050 年, 这一数字有可能突破 20 亿, AMD 已成为发达国家老年人中致盲的首要原因。目前全球大约有 3000 ~ 5000 万 AMD 患者, 其中 90% 的患者由于脉络膜新生血管 (CNV) 形成而造成严重视力损害^[1]。AMD 大多发生于 55 岁以上老年人, 是局限于视网膜黄斑区的一种退行性病变。从临床和病理特征来看, 年龄相关性黄斑变性晚期多表现为两种不同的形式: 地图状萎缩 (GA), 又被称为干性 AMD; CNV, 即湿性 AMD。在湿性 AMD 中, 新生血管从视网膜色素上皮 (RPE) 层下向上生长, 直至突破 RPE 层, 生长于视网膜下、视网膜内或视网膜上, 造成反复出血, 严重威胁患者视力, 并最终导致视力完全丧失。在这两种类型中, GA 发展相对缓慢, 而 CNV 发展速度很快。目前, 由于其发病机制复杂, 至今还没有一种成熟的临床治疗方案, 虽然光动力治疗和抗 VEGF 药物的出现为该病的治疗提供了一线曙光, 但仍有约 2/3 的患者治疗后视力不提高, 1/6 患者最终发展为盲^[2-4]。

湿性 AMD 由于其对视力威胁严重, 发展迅速, 已成为目前眼底病研究的焦点之一。目前的研究显示湿性 AMD 患者 CNV 的产生与多种细胞因子, 如色素上皮细胞衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF)、VEGF-A、血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、炎性细胞因子—肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL) 等有关^[5,6], 其中研究最多也是最深入的就是 VEGF, 并由此衍生出抗 VEGF 类药物, 且取得了不错的临床治疗效果, 但该类药物对视网膜具有毒性也屡见报道^[7-9], 最近的研究显示应用该类药物也可能导致脑血管意外发病率的提高^[10]。

2009 年 Takeda 等^[11]发表于 NATURE 的研究结果证明, 趋化因子受体 3 (CCR3) 特异性表达于湿性 AMD 患者的 CNV 中, 并且证明了 CCR3 及其配体在 CNV 形成过程中的重要作用, 通过抗-CCR3 抗体和基因敲除方法抑制 CCR3 及其配体, 可使激光诱导实验鼠模型的 CNV 面积明显减小, 亦能显著抑制 CNV 的体积。CCR3 有望成为早期发现 CNV 形成甚至湿性 AMD 发生的检测指标。现就 CCR3 的结构、功能及其在湿性 AMD 疾病中的可能

发生机制、存在问题及应用前景作一综述。

1 CCR3 的结构及其配体的结构与功能

CCR3 是一种趋化因子受体,属 G 蛋白偶联受体家族^[12]。CCR3 基因位于染色体 3p21.3,并且具有多态性。CCR3 主要表达于嗜酸性粒细胞,此外还表达于肥大细胞、Th2 淋巴细胞、嗜碱性粒细胞等^[13-15]。CCR3 的配体中最主要的是 CCL 类配体^[16,17],主要包括 eotaxin-1 (CCL-11)、eotaxin-2 (CCL-24) 和 eotaxin-3 (CCL-26) 等;此外,CCR3 配体还包括趋化因子 Rants、巨噬细胞炎性蛋白-1a (MIP-1a)、单核细胞趋化蛋白 MCP-2、MCP-3、MCP-4 等。嗜酸性粒细胞趋化因子 (eotaxin) 作为 CCR3 的配体,对嗜酸性粒细胞具有特异性趋化作用。CCR3 与配体结合后激活瞬时钙离子流、蛋白激酶 C 等信号转导和转录蛋白、丝裂原活化蛋白激酶的活化等一系列生化效应,对嗜酸性粒细胞、Th2 细胞、肥大细胞等产生趋化作用,在过敏性疾病例如哮喘的发生中起到重要作用^[18-20]。

近期的研究显示 CCR3 也可以表达于 RPE 细胞中^[15,16]。2011 年 Wang 等^[17]的研究结果显示,CCR3 亦可表达于脉络膜血管内皮细胞 (CECs) 中。因此,有关 CCR3 在眼部的作用的研究逐渐开展起来。Ambati 等^[21]观察到 CCR3 表达于未经治疗的 CNV 患者的脉络膜血管内皮细胞 (choroidal endothelial cells, ECEs) 内。与此同时,他们还发现在年龄相符的健康或者患有其它增殖性病变的 ECEs 中并不表达 CCR3,也就是说 CCR3 特异性表达于湿性 AMD 的 CNV 中。有趣的是,在这些表达 CCR3 的 CNV 组织内,它的 3 种自然配体也同样被检测到,但并没有检测出嗜酸性粒细胞或巨嗜细胞。如果嗜酸性粒细胞或巨嗜细胞的出现是炎症或过敏反应的标志的话,该研究显示 CNV 形成过程中 CCR3 并不是通过炎症路径而起作用的。

2 CCR3 与 CNV 形成

Takeda 等^[11]指出 CCR3 参与了 CNV 的血管生成而不是炎症。他们证明无论在体外培养的人 CECs 细胞还是在激光诱导 CNV 鼠的体内,阻断 CCR3 的功能均抑制了新生血管的形成。抗-CCR3 抗体阻止了新生血管形成前的管腔形成,并减少了 CECs 的增殖。

既往研究证明炎症细胞如嗜酸性粒细胞和巨嗜细胞在血管生成中具有重要作用。这些细胞既是血管生成媒介物的来源同时又是它们的靶标。Puxeddu 等^[22]最近的研究显示了炎症细胞与血管生成之间的联系,炎症细胞通过释放 VEGF 促进血管生成。如果在 CNV 中也是这样的话,那么阻断 CCR3 功能除了抑制新生血管的作用外是否也同时抑制了炎症反应呢? Takeda 等^[11]的观察显示,在野生型激光诱导 CNV 模型鼠中的结果是否定的。首先,激光诱导后,炎症免疫反应细胞 (IR, 如嗜酸性粒细胞和巨细胞) 在脉络膜中是缺失的。更重要的是,在嗜酸性粒细胞和巨嗜细胞缺失的激光诱导实验鼠中,与野生型实验鼠一样,抗-CCR3 抗体同样可起到显著抑制 CNV 的作用。这两组实验共同证明了激光诱导 CNV 的产生并不需要嗜酸性粒细胞或巨嗜细胞的参与。

中性粒细胞和巨噬细胞却是实验性 CNV 产生的不可或缺的因素^[23]。这些炎症免疫细胞的参与不受 CCR3 的影响。因此阻断 CCR3 所产生的抗血管生成作用是对新生血管化的直接抑制,而不是对细胞免疫反应的抑制。

2009 年, Takeda 等^[11]发现 CCR3 特异性表达于 CNV 中,并且利用生物标记的 Qdot-CCR3 片段,对 CCL2/CCR2-/-鼠进行检测,可以早期发现 CNV。与此同时, CCR3 抗体和基因敲除方法抑制 CCR3 及其配体,能够使

激光诱导实验鼠模型中的 CNV 面积明显缩小。这项研究对 CNV 的治疗和早期发现具有重大意义。Grant^[24]研究认为 CCR3 可以成为早期发现湿性 AMD 发生的检测指标,其抗体或拮抗剂可能成为治疗 CNV 新的研究方向。Baffi 等^[15]研究发现,在激光诱导 CNV 实验鼠模型有 CCR3 及其配体的表达,而敲除 CCR3 及配体的基因时, CNV 的形成受到抑制,因此认为 CCR3 及其配体是湿性 AMD 脉络膜新生血管形成的重要分子靶标。此后 Kleinman 等^[25]和 Mizutani 等^[26]的研究进一步支持了上述观点。但也有研究认为, CCR3 在 CNV 形成中的重要性值得质疑^[27]。Li 等^[28]使用 CCR3 拮抗剂和 CCR3 抗体对实验性 CNV 进行治疗,结果显示并没有明显的治疗作用,认为 CCR3 在 CNV 的发展中没有显著作用,我们认为这种结果的产生可能与实验条件的不同有关。

研究发现, CCR3 特异性表达于湿性 AMD 患者 CECs 上,而在其它引起 CNV 的疾病如脉络膜黑色素瘤、视网膜前纤维增生膜等脉络膜血管增生中并不表达^[11]。但我们认为这些研究结果报道数量较少, CCR3 是否表达于其它疾病引起的 CNV 中仍需更多的研究证实。如果确认在其它疾病引起的 CNV 中没有表达,那么 CCR3 在湿性 AMD 中特异表达的启动因子及下游作用靶标是什么呢? 这些都有待于我们进一步研究。

我国学者也对利用中医凉血化瘀法对湿性 AMD 的治疗进行了研究^[29], 研究应用流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的表达, 结果发现治疗后新生血管性 AMD 患者外周血 T 淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面 CCR3 表达均高于健康对照组 ($P < 0.01$)。萎缩型 AMD 患者外周血 CCR3 表达和健康对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。湿性 AMD 患者治疗前后外周血 CCR3 的表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。因而得出湿性 AMD 脉络膜新生血管的形成可能与外周血 T 淋巴细胞及 (或) 嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的高表达有关, 而凉血化瘀法能有效治疗湿性 AMD CNV, 却与 CCR3 表达不相关。因此推断 T 淋巴细胞和/或嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的高表达可能是湿性 AMD 患者 CNV 形成的因素之一, 采用 CCR3 拮抗剂降低 CCR3 表达可能减少 CNV 的形成。

研究发现^[14,15], CCR3 通过诱导 CECs 的迁徙而起到促进 CNV 形成的作用。Baffi 等^[15]研究发现, 阻断 CCR3 抑制了 CECs 的增生, 从而抑制 CNV 管腔形成。Takeda 等^[30]也对激光诱导实验鼠模型进行了研究, 证实损伤时 CECs 表达 CCR3 增加。

最新研究发现^[31-33], CCR3 通过 VEGF 通路和 Notch 信号通路作用于 CECs, CCR3 抑制剂可以阻止 VEGF 介导的 CECs 迁徙及 Racl 活化。目前 CCR3 的下游作用通路还不是十分明确, 可能是通过 VEGF 和 Notch 通路等作用于 RPE 细胞、CECs 等视网膜、脉络膜相关细胞, 影响了 VEGF 及其受体所维持的平衡状态, 上调相关新生血管生成因子, 从而导致了 CNV 的形成。但是否 CCR3 及其配体单独形成一个通路促进 CNV 的形成还没有得到确认。

3 未来可能的研究方向

在临床中, 目前的荧光血管造影技术仅仅能够发现侵入视网膜的 CNV, 而这对早期诊断 AMD 是没有价值的。Takeda 等试验抗 CCR3 抗体的 F_{ab} 片段是否可产生稳定的、高密度荧光的 Qdots (Quantum Dots), 它可聚合物包覆纳米半导体材料结合, 这点可以被用来发现并可视话隐匿性 CNV (如敲除了单核细胞趋化蛋白 1, CCL22/2, 和/或 CCL22/2 的受体的小鼠)。静脉注射 Qdot-CCR3- F_{ab} 可

以方便我们发现还没有侵入视网膜的、增殖性的脉络膜 CCR3+血细胞。如果可以简单的把试验鼠的研究成果引用到治疗人类疾病中去,那么利用 CCR3 作为一种早期发现人类 CNV 的标记物是可行的。然而,利用 Qdots 进行人体内试验还处于起始阶段,可以用于临床还不确定。

临床上采用光动力疗法和抗 VEGF 药物治疗 CNV 取得了一定效果,但仍有约 2/3 的患者视力不能得到提高,这提醒我们是否应该寻找除了上述两种治疗方法之外的更好的治疗手段。

通过本文的综述,抗 CCR3 治疗可能会成为下一个治疗 CNV 性疾病的手段之一。如果将抗 CCR3 和抗 VEGF 治疗联合起来应用,可能是同时应用,也可能是序贯应用,再观察这种联合是否会起到不可思议的治疗效果也是个值得研究的方向。

目前关于 CCR3 在 CNV 性疾病中的作用研究刚刚起步,有关 CCR3 及其配体生理状态下在眼部的分布、CCR3 是否只存在于 AMD 导致的 CNV 中以及 CCR3 及其配体在 CNV 性疾病发生中的病理生理变化及具体机制均不明了,CCR3 抗体对 CNV 的治疗是否有效尚待进一步研究。

目前的实验研究对象是激光诱导 CNV 实验鼠,这与 CNV 的实际发生原因是明显不同的,因此其研究结果是否对临床所见的湿性 AMD 有效还不能确定,因此未来通过基因鼠模型来研究 CCR3 的作用机制将使得结果更加令人信服。

CCR3 可能是早期 AMD 发生、发展的关键分子,由于阻断 CCR3 的作用仅局限于视网膜色素上皮周围的血管,因此副作用很少,这点对未来药物的开发具有重要的依据价值。

综上所述,CCR3 对湿性 AMD 的诊断和治疗都具有重要的作用,但仍需大量研究结果进一步支持,随着对 CCR3 感兴趣的研究者越来越多,相信大量有价值的研究 CCR3 在 CNV 形成中的分子机制的实验结果即将出现,为未来早期诊断和治疗湿性 AMD、寻找新一代药物提供依据。

参考文献

- 1 Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age - related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003; 48:257-293
- 2 Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351:2805-2816
- 3 Brown DM, Kaiser PK, Michels M, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1432-1444
- 4 Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1419-1431
- 5 Grant MB, Afzal A. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Opin Invest Drugs* 2004;13(10):1275-1293
- 6 Lee YC. The involvement of VEGF in endothelial permeability: a target for anti-inflammatory therapy. *Curr Opin Investing Drugs* 2005;6(11):1124-1130
- 7 Famiglietti EV, Stopa EG, McGookin ED, et al. Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor in neurons and glial cells of human retina. *Brain Res* 2003;969:195-204
- 8 Nishijima K, Ng YS, Zhong L, et al. Vascular endothelial growth factor - A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol* 2007;171:53-67
- 9 Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller

cells and photoreceptors. *PLoS ONE* 2008; 3:e3554

- 10 Ueta T, Yanagi Y, Tamaki Y, et al. Cerebrovascular accidents in ranibizumab. *Ophthalmology* 2009;116:362
- 11 Takeda A, Baffi JZ, Kleinman ME, et al. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature* 2009;460:225-230
- 12 Combadiere C, Ahuja SK, Murphy PM. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. *J Biol Chem* 1996;271:147-152
- 13 De Lucca GV. Recent development in CCR3 antagonists. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2006;9:516-524
- 14 Juremalm M, Nilsson G. Chemokine receptor expression by mast cells. *Chen Immunol Allergy* 2005;87:130-144
- 15 Baffi JZ, Takeda A, Nozaki M, et al. CCR3 and eotaxins are specific neovascular targets in age - related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:E1538
- 16 Daugherty BL, Siciliano SI, Demartino JA, et al. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med* 1996;183:2349-2354
- 17 Wang H, Wittchen ES, Jiang Y, et al. Upregulation of CCR3 by age-related stresses promotes choroidal endothelial cell migration via VEGF-dependent and -independent signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:8271-8277
- 18 Erin EM, Williams TJ, Barnes PJ, et al. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:201-204
- 19 Errahali YJ, Taka E, Abonyo BO, et al. CCL26 - targeted siRNA treatment of alveolar type II cells decreases expression of CCR3 - binding chemokines and reduces eosinophil migration: implications in asthma therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:227-239
- 20 Shen HH, Xu F, Zhang GS, et al. CCR3 monoclonal antibody inhibits airway eosinophilic inflammation and mucus overproduction in a mouse model of asthma. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:1594-1599
- 21 Ambati J, Anand A, Fernandez S, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Cer-2-deficient mice. *Nat Med* 2003;9:1390-1397
- 22 Puxeddu I, Berkman N, Nissim Ben Efraim AH, et al. The role of eosinophil major basic protein in angiogenesis. *Allergy* 2009;64:368-374
- 23 Tsutsumi-Miyahara C, Sonoda KH, Egashira K, et al. The relative contributions of each subset of ocular infiltrated cells in experimental choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1217-1222
- 24 Grant M. Vision: new light on allergy receptor. *Nature* 2009;460:182-183
- 25 Kleinman ME, Cho W, Baffi JZ, et al. Pro-vascular mechanisms and *in vivo* imaging strategies of CCR3, a specific biomarker for neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:E4303
- 26 Mizutani T, Ashikari M, Tokoro M, et al. CCR3 antagonist suppress laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:E1014
- 27 Mason AB, Hoh J. CCR3: shedding new light on a dark problem? *J Mol Cell Biol* 2009;1:17-19
- 28 Li Y, Huang D, Xia X, et al. CCR3 and choroidal neovascularization. *PLoS One* 2011;6:E17106
- 29 胡艳红, 祁明信, 陈摇胜. 凉血化瘀法干预老年性黄斑变性 CNV 与外周血 CCR3 表达的相关研究. *国际眼科杂志* 2013;13(3):546-548
- 30 Takeda A, Nozaki M, Raislet BJ, et al. CCR3 blockade suppresses experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:E1529
- 31 Juremalm M, Nilsson G. Chemokine receptor expression by mast cells. *Chen Immunol Allergy* 2005;87:130-144
- 32 Ahmad I, Balasubramanian S, Del Debbio CB, et al. Regulation of ocular angiogenesis by notch signaling: implications in neovascular age-related macular denegeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:2868-2878
- 33 Jeganathan VS, Verma N. Safety and efficacy of intravitreal anti-VEGF injections for age - related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2009;20:223-225