

# NSA2 在激光诱导的小鼠脉络膜新生血管模型中表达的 时相性和定位研究\*

付鹏 彭惠\*\* 陈新科 王隽 祝毅 雷博

(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科, 重庆 400016; 2. 重庆市眼科学重点实验室, 重庆 400016)

**摘要:**目的 探讨 NSA2 在激光诱导的小鼠脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)模型眼组织中的表达及其意义。方法 532 nm 激光诱导 C57BL/6J 小鼠 CNV 模型。用 CD31 抗体标记血管内皮细胞的方法对 CNV 模型进行鉴定,采用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测正常对照组和光凝后 1 d、3 d、5 d、7 d 和 14 d 组小鼠 CNV 中 NSA2 mRNA 和蛋白表达的时间变化规律。取光凝后 7 d 组小鼠眼做眼球冰冻切片,用免疫荧光染色方法对 NSA2 蛋白在 CNV 中的表达进行定位研究。结果 NSA2 在正常小鼠的视网膜脉络膜组织中弱表达。视网膜光凝后,NSA2 mRNA 和蛋白在 CNV 模型眼组织中的表达有明显的时间变化规律,光凝后 1~3 d 逐渐增强,3 d 达高峰,之后逐渐减弱,14 d 时仍稍高于正常水平。同时发现 NSA2 在 CNV 区域表达较强。结论 NSA2 在 CNV 形成早期表达上调,具有明显的时间变化规律,且在 CNV 区域有较强的表达,因此我们推断 NSA2 可能在 CNV 形成这一病理过程中起着重要作用。

**关键词:** NSA2; 脉络膜新生血管; 年龄相关性黄斑变性

中图分类号: R743.4 文献标识码: A

## Study on Expression Phase and Localization of NSA2 in Choroidal Neovascularization Model in Mice Induced by Laser\*

FU Peng PENG Hui\*\* CHENG Xinke WANG Jun ZHU Yi LEI Bo

(1. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016;

2. Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing 400016)

**Abstract:** **Objective** To study the expression of NSA2 in eye tissues of choroidal neovascularization model in mice and its significance. **Methods** The CNV models were induced by 532 nm laser in C57BL/6J mouse and were identified by the method of CD31 antibody labeled with endothelial cells. The expression of NSA2 mRNA and protein in CNV were examined by RT-PCR and Western blotting at 1 day, 3 days, 5 days, 7 days and 14 days after photocoagulation respectively. The localization of NSA2 protein in CNV models were detected by immunofluorescence staining at 7 days after photocoagulation. **Results** NSA2 were weakly expressed in the retinal and choroid tissues. The expression intensity of NSA2 was gradually enhanced from 1 day through 3 days after photocoagulation, and reached the maximum at 3 days after photocoagulation, at 14 days it still slightly higher than normal levels. We also found high expression of NSA2 in the CNV areas. **Conclusion** Expression of NSA2 were enhanced in the early period of CNV formation, and it highly expressed in the CNV areas, so we infer that NSA2 may play an important role in the pathogenesis of CNV.

**Key words:** NSA2; choroidal neovascularization; age related macular degeneration

## 1 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration AMD)又称老年性黄斑变性,是发达国家和我国发达城市 50 岁以上老年人群视力慢性不可逆性损害甚至失明的最主要的眼病<sup>[1-3]</sup>。脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是 AMD 特别是湿性 AMD、病理性近视和中心性浆液性脉络膜视网膜病变等眼病致盲的主要原因<sup>[4]</sup>,其病变特征是在各种因素的作用下 CNV 逐渐形成,并穿过 RPE 细胞层和 Bruch 膜,如未得到及时治疗,新生血管将进一步发展致视网膜内或视网膜下出血、渗出甚至视网膜脱离,使视网膜活性细胞受损,最终导致视力丧失<sup>[5]</sup>。CNV 的形成机制尚不清楚,多种因子可介导 CNV 的形成。

NSA2(Nop seven-associated 2)是一种参与细胞增殖和细胞周期调控的核蛋白,因 TGF- $\beta$  可上调 NSA2 的表达,故又将其称为 TGF- $\beta$  诱导的核蛋白<sup>[6]</sup>,它广泛表达于人体组织和体外培养细胞的细胞核中。研究显示 NSA2 对多种细胞

的增殖生长具有重要的促进作用,其机制可能是通过促进细胞周期从 G1 期向 S 期转变,从而达到对细胞增殖生长和细胞周期的调控作用<sup>[6]</sup>。

本研究通过激光诱导 C57BL/6J 小鼠 CNV 动物模型,用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测在 CNV 形成过程中 NSA2 mRNA 和蛋白表达的时间规律;用免疫荧光染色方法对 CNV 模型眼组织中 NSA2 的表达进行定位研究,从而探讨 NSA2 在 CNV 形成过程中的作用,以期进一步探讨 CNV 的形成机制,为寻找新的治疗 AMD 的方法提供理论和实验依据。

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 实验动物

健康成年雌性 C57BL/6J 小鼠 66 只,体重 18~22 g,鼠龄 6~8 周,系清洁级动物,由重庆医科大学实验动物中心提供并代养,实验前双眼前段及眼底检查均正常。

#### 2.1.2 试剂

兔抗 NSA2 多克隆抗体(北京大学人类疾病基因研究中心);CD31(Santa Cruz);DAPI(上海炎彬化工科技有限公

\* 重庆市卫生局科研项目(2010-02-073)资助项目  
\*\* E-mail: pengh9@yahoo.com.cn

司);FITC 标记山羊抗兔 IgG(H + L)(碧云天);Trizol、逆转录和 PCR 试剂盒(大连宝生物);BCA 蛋白定量试剂盒(博士德)。

### 2.1.3 仪器

532nm 倍频眼底激光器(法国 Quantel Medical 公司);解剖显微镜、荧光显微镜(德国 Leica 公司);低温高速离心机(sigma);酶标仪、PCR 仪、凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司)。

## 2.2 分法

### 2.2.1 动物分组

66 只(132 眼)C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组,即光凝后 1 d 组 12 只、光凝后 3 d 组 12 只、光凝后 5 d 组 12 只、光凝后 7 d 组 15 只和光凝后 14 d 组 15 只,所有实验动物行右眼建模,左眼作为正常对照。

### 2.2.2 CNV 模型的诱导

双眼滴用复方托吡卡胺滴眼液散瞳,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(10 ml/kg)麻醉小鼠,实验眼滴用医用透明质酸钠凝胶,眼前放置 2 cm × 2 cm 盖玻片,经裂隙灯用 532 nm 激光(参数:功率 200 mW,光斑直径 100 μm,曝光时间 100 ms),距视盘 1.5 ~ 2 PD 左右位置以视盘为中心进行光凝,其中行 CNV 模型鉴定和免疫荧光染色组小鼠光凝 4 ~ 6 点/眼;行 RT-PCR 和 Western blot 组小鼠光凝 20 点/眼,光凝后有气泡产生标志击破 Bruch 膜,记为有效点<sup>[7]</sup>。研究者已参加实验动物资质培训,并获得了实验动物资格证书,所有操作遵守实验动物伦理管理委员会的相关规定。

### 2.2.3 CNV 模型的鉴定

用 CD31 抗体标记血管内皮细胞的方法对 CNV 模型进行鉴定:从光凝后 14d 组中取出 3 只右眼光凝 4 ~ 6 点的 CNV 模型鼠,用戊巴比妥钠过量麻醉处死,迅速摘除眼球,于 4% 多聚甲醛中固定 2 ~ 3h 后,在解剖显微镜下去除眼外筋膜及肌肉组织,去除眼前段,分离出视网膜,将脉络膜-巩膜组织以视乳头为中心从外向内做 5 个放射状切口,形成 5 个瓣,铺于载玻片上,将载有脉络膜-巩膜组织的玻片浸泡于含有 0.5% Triton 的 PBS 溶液,于 -80℃ 冰箱中放置 15 min,取出玻片,用含有 0.5% Triton 的 PBS 溶液漂洗,加入一抗 CD31(用含有 2% 胎牛血清和 2% Triton 的 PBS 配制),4℃ 过夜,次日用 PBS 漂洗样本 3 次,加入二抗 37℃ 孵育 2h, PBS 漂洗后加入抗淬灭剂,50% 甘油封片,用荧光显微镜观察并照相。

### 2.2.4 RT-PCR

从各组中随机抽取 6 只小鼠过量麻醉处死,迅速摘除眼球,在解剖显微镜下去除眼外筋膜和肌肉组织,切除眼前段,分离出视网膜-脉络膜-巩膜复合物,以 2 只眼的视网膜-脉络膜-巩膜复合物作为一个样本,提取总 RNA,取 1000ng RNA,按逆转录试剂盒说明书操作步骤逆转录 cDNA。引物由上海生工设计并合成,序列如下:

NSA2(361)上游:5 AAGGCATGGAAGAGAATGGTTA 3,  
下游:5 GTCACGTGTCAGACCAGCAAGAC 3;  
β-actin(517)上游:5 ATATCGCTGCGCTGGTC GTC 3,  
下游:5 AGGATGGCGTGAGGGAGAGC 3。

扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像分析仪采集图片并用 Quantity One 软件分析灰度值。

### 2.2.5 Western Blot

从各组中随机抽取 6 只小鼠过量麻醉处死,迅速摘除眼球,在解剖显微镜下去除眼外筋膜和肌肉组织,切除眼前段,分离出视网膜-脉络膜-巩膜复合物,以 2 只眼的视网膜-脉络膜-巩膜复合物作为一个样本。加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂,用超声匀浆器匀浆,提取总蛋白,进行 Western Blot,以 GAPDH 为内参,结果用 Quantity One 软件分析灰度值,以各组 NSA2 条带的灰度值与其相应的内参条带的灰度值的比值作为 NSA2 蛋白表达的相对量。

### 2.2.6 免疫荧光染色

从光凝后 7d 组中取出 3 只右眼光凝 4 ~ 6 点的 CNV 模型鼠,用戊巴比妥钠过量麻醉处死,迅速取出眼球,用 OCT 包埋,行冰冻切片,片厚约 3 μm,置于冷丙酮中固定 15 min, PBS 漂洗后,加免疫荧光封闭液 37℃ 封闭 1 h,甩干封闭液,加一抗,阴性对照加 PBS,4℃ 过夜,次日用 PBS 漂洗后加入二抗,37℃ 温箱中孵育 2 h, PBS 漂洗后再加入 DAPI,室温下避光放置 15 min 染胞核, PBS 漂洗后加 50% 甘油封片,在荧光显微镜下观察照相。

### 2.2.7 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm S$  表示,采用 SPSS 12.0 软件单因素方差分析(AVONA)及 t 检验对 RT-PCR 和 Western blotting 结果进行统计学分析,P < 0.05 认为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 CNV 模型检测结果

脉络膜铺片,用 CD31 抗体标记血管内皮细胞的方法对 CNV 模型进行鉴定的结果显示:在光凝后 14d 组 CNV 模型鼠的视网膜光凝部位可见明显的绿色荧光团块,而在未接受视网膜光凝的部位未见明显的荧光团块(图 1),提示视网膜光凝部位有新生血管形成,从而表示 CNV 模型诱导成功。

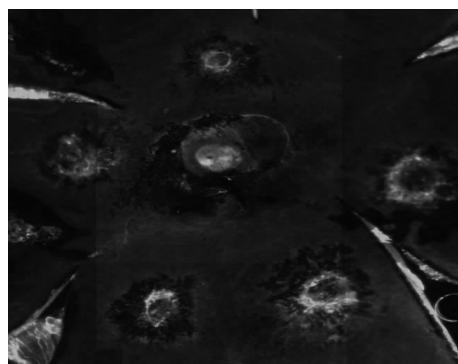


图 1 CD31 标记血管内皮细胞鉴定 CNV 模型结果

Figure 1 The results of CNV model identified by the method of CD31 antibody labeled with vascular endothelial cells

### 3.2 RT-PCR 结果

结果显示 NSA2 mRNA 在正常成年 C57BL/6J 小鼠视网膜-脉络膜-巩膜组织中弱表达;光凝后 1 d 其表达上调,3 d 达高峰,之后逐渐下降(图 2)。半定量分析:光凝后 1 d、3 d、

5 d、7 d 组 NSA2 mRNA 的表达明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 光凝后 3 d 组 NSA2 mRNA 的表达量明显高于其余各组, 差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

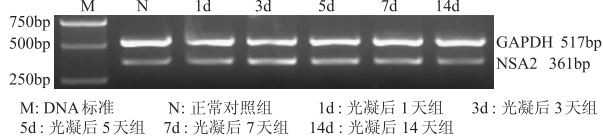


图 2 NSA2 RT-PCR 电泳图

Figure 2 The electropherogram of RT-PCR

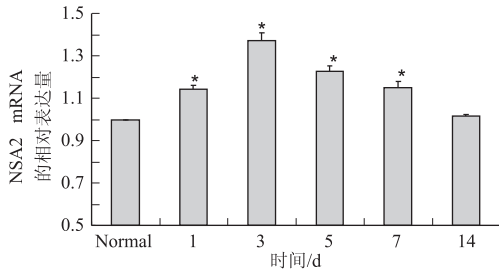


图 3 半定量分析 NSA2 mRNA 在光凝后不同时间点的相对表达量

Figure 3 Semiquantitative analysis the relative expression of NSA2 mRNA in different times after laser induced

### 3.3 Western Blot 结果

NSA2 蛋白在正常成年 C57BL/6J 小鼠视网膜-脉络膜-巩膜复合物中弱表达。光凝后 1 d 其表达逐渐上调, 3 d 达高峰, 之后逐渐下降, 14 d 时仍稍高于正常水平 (图 4)。半定量分析: 光凝后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 组 NSA2 mRNA 的表达明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 光凝后 3 d 组和 5 d 组 NSA2 蛋白的表达量明显高于其余各组, 差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但 3 d 组和 5 d 组间比较无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。

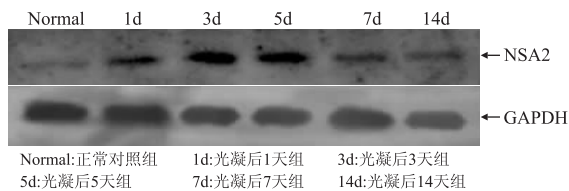


图 4 Western blot 检测 NSA2 蛋白表达

Figure 4 Detection of NSA2 protein expression by Western blot

### 3.4 免疫荧光染色结果

眼球冰冻切片, 行免疫荧光染色观察 NSA2 蛋白在正常鼠和 CNV 模型鼠眼组织中的表达情况, 结果显示: NSA2 蛋白在正常小鼠视网膜外丛状层有较强表达 (图 6); 在光凝后 7 d 组 CNV 模型鼠眼组织中, NSA2 蛋白除了在视网膜外丛状层中有表达外, 在 CNV 区域也有较强的表达 (图 7)。

## 4 讨论

激光诱导 C57BL/6J 小鼠 CNV 动物模型是一种可靠并被广泛应用于研究脉络膜新生血管性疾病的模型, 其机制主要是: (1) 视网膜光凝后即使 Bruch 膜失去完整性, 也可由于炎性细胞的浸润造成 Bruch 膜破坏, 从而促使 CNV 形成; (2) 光凝区脉络膜微血管阻塞, 使局部组织缺血缺氧, 刺激多

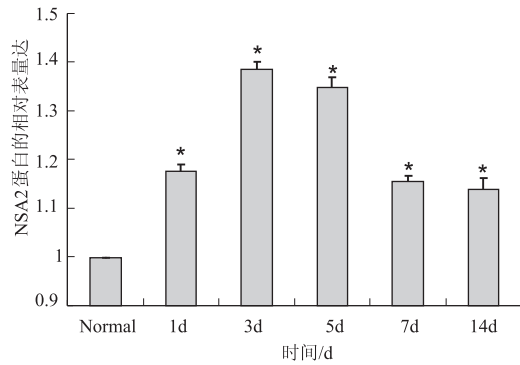


图 5 半定量分析 NSA2 蛋白在光凝后不同时间点的相对表达量  
Figure 5 Semiquantitative analysis the relative expression of NSA2 protein in different times after laser induced

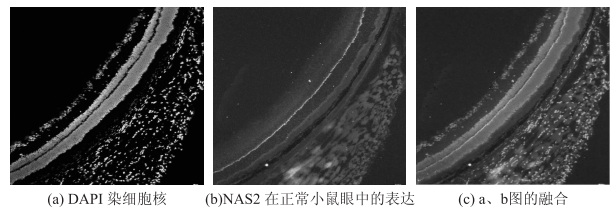


图 6 免疫荧光染色法检测 NSA2 蛋白在正常小鼠眼组织中的表达  
Figure 6 Immunofluorescence staining of NSA2 protein in normal eye tissues of mouse

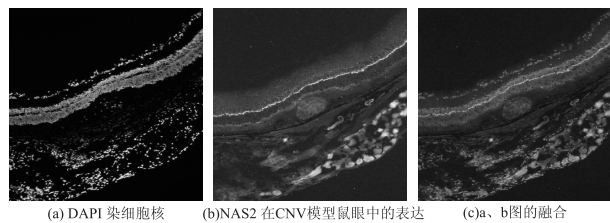


图 7 免疫荧光染色法检测 NSA2 蛋白在 CNV 模型鼠眼组织中的表达  
Figure 7 Immunofluorescence staining of NSA2 protein in CNV model eye tissues of mouse

种生长因子的分泌和活化, 也可直接刺激多种生长因子的分泌和活化, 从而促使 CNV 形成<sup>[8,9]</sup>。在本实验中, 我们采用 CD31 抗体标记血管内皮细胞的方法对 CNV 动物模型进行鉴定, 此方法不但操作简单, 而且可以避免其他方法如心脏灌注 FITC-dextran 法在新生血管形成早期, 当毛细血管管腔尚未形成时无法准确完全的显示出新生血管的不足, 是一种有效的可以被广泛应用的 CNV 模型鉴定方法。本实验中实验组小鼠脉络膜新生血管生成率约为 80%, 与国外文献所报道的成功率相符合<sup>[10]</sup>, 因此这是一种稳定可靠的模型, 可保证实验结果的可靠性。

研究表明 AMD、近视性黄斑病变 (MMD) 已成为我国发达城市老年人导盲的主要原因<sup>[11]</sup>, 然而不幸的是对于大多数的 AMD 和 MMD 患者来说, 视力的损害是难以预防和完全恢复的, 其中脉络膜新生血管形成是这两种疾病致盲的首要原因, 且这两种眼病的新生血管往往位于黄斑下及其附近, 所以难以用激光治疗或激光治疗效果不佳。尽管光动力学疗法等新式治疗手段的出现为这一类新生血管性疾病的治

疗提供了可能,但是大多数患者视力预后不良。因此亟待进一步阐明脉络膜新生血管的形成机制,以望从分子水平寻找这类疾病的治疗方法。

新生血管形成是一个极其复杂的生物学过程,通常由一系列井然有序的事件所构成:血管内皮细胞的增殖移行、细胞外蛋白水解、导管形成和血管壁的重建等<sup>[12]</sup>。脉络膜新生血管性疾病的发病机制及其治疗是目前眼科研究的热点和难点。多种因子参与到了脉络膜新生血管的形成过程中,如 VEGF、BFGF、PDGF、FGF、TGF- $\beta$ 、TNF- $\beta$ 、白介素等<sup>[12,13]</sup>。

NSA2 又称为 TGF- $\beta$  诱导的核蛋白 1(TINP1)和毛细胞白血病蛋白 1(HCL-G1),最初是在一次高通量筛选与细胞增殖相关的人类基因中发现,它广泛表达于人体组织和体外培养的多种细胞系中,且以不同的细胞系作为研究对象发现 NSA2 蛋白高表达可促进细胞生长和促使细胞周期从 G1 期向 S 期转变,用 siRNA 干扰 NSA2 的功能后细胞生长和细胞周期的转变被抑制<sup>[6]</sup>,因此推断 NSA2 可能是一种与细胞增殖和细胞周期调控关系密切的核蛋白,但是其机制还有待进一步研究。

研究显示激光诱导小鼠 CNV 模型后 1 周内新生血管增生最为活跃,光凝后第 7 天可见脉络膜新生血管形成,到第 2 周时血管增生已基本稳定,新生血管量达到最高峰,2~4 周后 CNV 组织趋向瘢痕化,新生血管量逐渐减少<sup>[14-16]</sup>。故本课题选择在光凝后第 1 至 14 天中的不同时间点对 CNV 动物模型眼组织中 NSA2 mRNA 和蛋白表达的时间规律进行研究;因为在光凝后第 7 天可检测到有明显的 CNV 形成,为了明确 NSA2 蛋白在 CNV 组织中是否有表达,故选择光凝后第 7 天行免疫荧光染色对 NSA2 蛋白在 CNV 模型眼组织中的表达进行定位研究。本研究中我们观察到,光凝后第 1 d, CNV 模型眼组织中 NSA2 mRNA 和蛋白的表达开始上调,第 3d 达高峰,之后逐渐下降,第 3d 和第 5d 组中 NSA2 mRNA 和蛋白的表达明显高于其余各组,14 d 时仍稍高于正常水平(图 2~5),且发现 NSA2 在增生活跃 CNV 区域表达较强(图 7b),这与 CNV 的病程和病理特征相吻合,因此我们推断 NSA2 可能在 CNV 的形成和发展过程中起着重要调控作用。

## 5 结束语

综上所述,NSA2 mRNA 和蛋白在激光诱导的小鼠 CNV 模型中表达的一系列特征表明 NSA2 可能参与并调节 CNV 的形成和发展过程,虽然其作用和机制尚不清楚,但这一发现将可能为探讨 CNV 的形成机制和为湿性 AMD 寻找新的临床治疗方法提供实验依据和方向。

## 参考文献

[1] RAMA D, JAGER M, D, WILLIAM F, et al. Age-related macular degeneration[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358(24):

2 606-2 617.

- [2] WANG W, DEAN D C, KAPLAN H J. Age-related macular degeneration[J]. *Discovery Medicine*, 2010, 9(44): 13-15.
- [3] HUANG X B, ZOU H D, WANG N, et al. A prevalence survey of blindness and visual impairment in adults aged equal or more than 60 years in Beixinjing blocks of Shanghai, China [J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2009, 45(9): 786-92.
- [4] CAMPA C, KASMAN I, YE W, et al. Effects of an Anti-VEGF-A Monoclonal antibody on laser induced choroidal neovascularization in mice: Optimizing methods to quantify vascular changes[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49: 1 178-1 183.
- [5] DANIEL M, ALBERT MD, MS, ANEESH NEEKHRA MD, et al. Development of Choroidal Neovascularization in Rats With Advanced Intense Cyclic Light-Induced Retinal Degeneration [J]. *Archives of Ophthalmology*, 2010, 128(2): 212-222.
- [6] ZHANG H Y, MA X, SHI T P, et al. NSA2, a novel nucleolus protein regulates cell proliferation and cell cycle [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 391(1): 651-658.
- [7] ASHIKARI M, TOKORO M, ITAYA M, et al. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by nontargeted siRNA [J]. *Investigation Ophthalmology & Visual Science*, 2010, 51(7): 3 820-3 824.
- [8] MILLER H, MILLER B, ISHIBASHI T, et al. Pathogenesis of laser-induced choroidal subretinal neovascularization [J]. *Investigation Ophthalmology & Visual Science*, 1990, 31(5): 899-908.
- [9] ETER N, ENGEL D R, MEYER L, et al. In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye [J]. *Investigation Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49(8): 3 649-3 658.
- [10] TOBE T, ORTEGA S, LUNA J D, et al. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model [J]. *American Journal of Pathology*, 1998, 153(5): 1 641-1 646.
- [11] WU L C, SUN X H, ZHOU X T, et al. Causes and 3-year-incidence of blindness in Jing-An District, Shanghai, China 2001-2009 [J]. *BioMed Central Ophthalmology*, 2011, 11(10): 1 471 -2 415.
- [12] OLSON J L, OLSON, COURTNEY R J, MANDAVA N. Intravitreal Infliximab and Choroidal Neovascularization in an Animal Model [J]. *Archives of Ophthalmology*, 2007, 125(9): 1 221-1 224.
- [13] KENT D, SHERIDAN C. Choroidal neovascularization: a wound healing perspective [J]. *Molecular Vision*, 2003, 9: 747-755.
- [14] 王康, 王康孙, 王玲, 等. 激光诱导小鼠脉络膜新生血管模型中 CD105 的表达 [J]. *眼科研究*, 2004, 22(1): 21-23.
- [15] KUROKI A M, BHUTTO I A, KITAOKA T, et al. Natural course of experimental choroidal neovascularization: three-dimensional study with corrosion cast and scanning electron microscope [J]. *Ophthalmic Research*, 2002, 34(4): 200-205.
- [16] 汪浩, 王文吉. 小鼠的脉络膜新生血管模型 [J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2004, 3: 158-160.