基础研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0704-03

核蛋白 NSA2 在脉络膜新生血管动物模型眼组织的表达研究

陈新科，彭 惠，雷 博，王 隽，付 鹏
（重庆医科大学附属第一医院眼科、眼科学重庆市市级重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：NSA2 是 1 种新发现的与细胞增殖相关的核蛋白，本实验旨在初步探讨 NSA2 是否参与了脉络膜新生血管（Choroidal neovascularization，CNV）病变过程。方法：采用 532 nm 波长的眼底激光对 16 只小鼠光凝处理，诱导 CNV 动物模型；小鼠眼底激光光凝处理 5 d 后，去除眼前段，定量 PCR 检测 NSA2 mRNA；眼球冰冻切片，用 NSA2 抗体对 NSA2 蛋白进行间接免疫荧光染色。结果：相对于未经过任何处理的正常对照组，CNV 组 NSA2 mRNA 表达明显上调（$P<0.05$）。较正常脉络膜组织，CNV 组织细胞 NSA2 阳性率明显增高（$P<0.05$）；CNV 区域附近的节细胞 NSA2 蛋白检测呈阳性，与之相对的正常对照组和 CNV 组中的远离 CNV 区域，均未发现 NSA2 阳性表达的节细胞。结论：NSA2 在 CNV 动物模型眼组织中表达上调，我们推测 NSA2 可能与 CNV 病变过程相关联。

【关键词】脉络膜新生血管；动物模型；核蛋白
【中国图书分类法分类号】R773.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-20

Expression of NSA2 in a mouse model of choroidal neovascularization

CHEN Xin-ke, PENG Hui, LEI Bo, WANG Juan, FU Peng
(*Department Of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology*)

【Abstract】*Objective*: NSA2, a newly documented nuclear protein, plays an important role in cell proliferation. We investigated whether NSA2 is involved in the choroidal neovascularization (CNV), a common pathological process in many retinal diseases. *Methods*: CNV model was induced by 532 nm laser coagulation in 16 mice. Five days after laser photocoagulation, NSA2 mRNA level in the posterior segment of the eyes was detected by Real-time quantitative PCR. NSA2 expression in eyeballs was detected by immunofluorescence staining with a NSA2 antibody on frozen sections. *Results*: Compared with the untreated control group, the level of NSA2 mRNA was scientifically up-regulated in the CNV group ($P<0.05$). Immunofluorescence showed that the rate of NSA2-positive cell in CNV tissue was higher than that in normal choroidal tissue ($P<0.05$); NSA2-positive ganglion cells were found near the CNV area in the treated eyes, but was not in the remote area of the CNV eyes and in the control eyes. *Conclusion*: We found that NSA2 was up-regulated in with a mouse model of CNV. Our data suggested that the nuclear protein may associate with the pathology of choroidal neovascularization.

【Key words】choroidal neovascularization; animal model; nucleoprotein

脉络膜新生血管（Choroidal neovascularization，CNV）对视网膜有很大的破坏性，使视力出现不可逆下降或丧失。发生 CNV 的眼底疾病年龄相关性黄斑变性（Age-related macular degeneration，AMD）现已经成为西方国家的首要致盲病因，在我国 AMD 发病率逐年升高，成为我国重要的致盲眼病[1-3]。CNV 的发生机制很复杂，至今仍不能很好的进行较为透彻的阐明，目前对 CNV 的治疗也存在局限。所以进一步深入研究 CNV 发病机制具有重要意义。

作者介绍：陈新科（1981-），男，硕士，研究方向：脉络膜新生血管的发病机制研究。
通信作者：彭 惠，女，教授，Email: pengh9@yahoo.com.cn。
基金项目：重庆市卫生局医学科学技术研究资助项目（编号：2010-2-073）。

真核细胞中核仁核糖体大亚基前体构成蛋白 NSA2，被 Heyu zhang 等人[4]证实参与癌细胞分裂增殖。NSA2 在CNV 中的表达情况以及与 CNV 发生过程中的细胞分裂增殖是否相关，目前还未见相关报道。本实验旨在探明 NSA2 在 CNV 中的表达情况，推测在 CNV 中的可能作用机制及意义。

1 材料和方法

1.1 CNV 实验动物模型制作

C56BL/6 小鼠，购买于重庆医科大学生命科学院动物中心，雌性，5~8 周龄，15~20 g。采用 532 nm 波长的眼底固体激光在裂隙灯下对右眼底进行定位光凝处理诱导 CNV，左眼作正常对照；激光光斑直径50 μm，能量200 mW，曝光时间0.1 s。

14 d 后心脏灌注 FITC-Dextran(sigma,2×10⁶ Da,5 mg/ml,含10%明胶),取出眼球,作脉络膜铺片,荧光显微镜下观察证实 CNV 动物模型造模的成功性。

1.2 定量 PCR 检测 mRNA

从 Genbank 获取小鼠 NSA2 mRNA 信息。将选用的mRNA编号发送给广州复能基因公司,由该公司设计定量 PCR 引物,并预先验证。内参基因选用 GAPDH。定量 PCR 引物的产品信息如表 1。

表 1 定量 PCR 引物信息

基因	mRNA 编号	引物 ID	引物产品货号	产物
GAPDH	NM_008084	Mm-QRP-20043	MQP027158	125 bp
NSA2	NM_021552.5	Mm-QRP-20126	MQP032696	144 bp

C56BL/6 小鼠 CNV 模型造模后 5 d,处死动物,取出眼球,立即在显微镜下去除眼前段(角膜、虹膜、睫状体、晶状体),冰上匀浆,提取总 mRNA。超微量分光光度计 NanoDrop 2000(美国赛默飞世尔,Thermo Scientific)测定 RNA 浓度;检测在 260、280 nm 的吸光值,直接获得 OD_{260}/OD_{280} 比值,鉴定 RNA 纯度, 所选用样本 OD_{260}/OD_{280} 比值全部控制在 1.8~2.0 之间。用试剂盒逆转录为 cDNA 后,-20℃予以保存。

使用含 SYBR Green 的定量 PCR 试剂盒,反应液的配制在避光条件下的冰上操作完成,设置阴性对照,采用标准的两步法进行检测。做出目的基因和内参基因的标准曲线,进行标准曲线分析后,选用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法相对定量分析检测结果。

1.3 冰冻切片免疫荧光染色

CNV 动物模型造模后第 5 天,处死动物,取出眼球,立即液氮速冻后,沿矢状柱进行冰冻切片。冰冻切片采用 4%多聚甲醛固定液固定 0.5 h 后,用 PBS 液洗涤 3 次,5%的正常山羊血清在室温下封闭 30 min。倾去血清,加入一抗工作液孵育(NSA2 抗体为兔来源的多克隆抗体;一抗工作液 0.5% triton,0.5% 山羊血清),4℃过夜;设置阴性对照。PBS 液洗涤 3 次,加入二抗工作液,避光,37℃,45 min。PBS 洗涤 3 次,Dapi 复染细胞核,常温,避光,15 min;PBS 洗涤 3 次,甘油封片,高倍荧光显微镜下照相,细胞计数统计细胞阳性率。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS18.0 统计软件,对 2 组的 NSA2 mRNA 表达和 NSA2 阳性细胞率进行 *Mann-whitney u* 检验。

2 结 果

2.1 CNV 动物模型

小鼠激光造模后 14 d,心脏灌注 FITC-Dextran,做脉络膜铺片,可见 CNV 形成,证实 CNV 造模成功(图 1)。

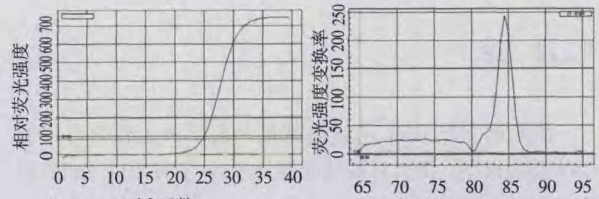
2.2 定量 PCR 反应

由目的基因和内参基因的扩增曲线可知,两基因的扩增效率恒定,相应的阈值循环数(Cycle threshold,Ct)稳定,重复性好;两基因的溶解曲线均为单峰特意,引物的特异性好,无引物二聚体产生(图 2)。



(激光:200 mW、0.1 s、50 μm)

图 1 脉络膜铺片显示激光诱导 CNV



Nsa2 扩增曲线　　Nsa2 溶解曲线

图 2 NSA2 扩增曲线和溶解曲线

目的基因 NSA2 和内参基因 GAPDH 以 10 倍梯度稀释后进行定量 PCR 反应检测,得出标准曲线,如图 3。根据标准曲线公式可知基因的斜率分别为 Agapdh=-3.378、Ansa2=-3.442,根据公式扩增效率,Egapdh=0.977、Ensa2=0.952,表明 2 个基因的扩增效率都接近 100%,相对误差不超过 5%,在该实验中可以选用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法进行相对定量分析。

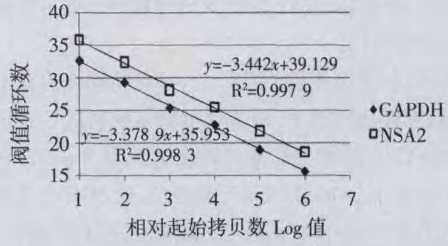


图 3 NSA2 和 GAPDH 定量 PCR 反应标准曲线

定量 PCR 检测结果经过 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法分析,CNV 组相对正常对照组拷贝数增加[(2.575±0.171)vs(1.332±0.048),$P<0.05$)]。

2.3 免疫荧光

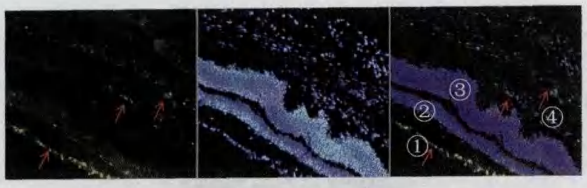
在正常脉络膜组织层 NSA2 阳性细胞率(0.128±0.047)(图 4),脉络膜新生血管组织(0.431±0.052)(图 5),CNV 组织较正常脉络膜组织 NSA2 蛋白升高($P<0.05$)。CNV 附近的节细胞呈阳性(图 4),与之相对的远离 CNV 区域的节细胞和正常对照组中的节细胞未发现阳性表达(图 5)。绿色荧光标记的 NSA2 蛋白与 Dapi 蓝色着染的细胞核重合,定位于细胞核。



①节细胞层;②内核层;③外核层;④色素脉络膜层

图 4 正常眼组织冰冻切片 NSA2 蛋白免疫荧光染色

(绿色荧光,箭头所示)



注：①节细胞层；②内核层；③外核层；④脉络膜新生血管层

图 5　CNV 眼组织冰冻切片 NSA2 蛋白免疫荧光染色（绿色荧光，箭头所示）

3　讨　论

激光诱导的 CNV 动物模型是目前国际上较为常用的 CNV 动物模型。激光对眼底光凝处理后，引发 RPE 细胞、血管内皮细胞等细胞分裂增殖形成 CNV。经脉络膜铺片观察证实 CNV 造模是成功的并且稳定。激光诱导 CNV 后第 5 天定量 PCR 检测 NSA2 mRNA 的转录升高约 1 倍（$P<0.05$），说明在正常情况下动物眼球后段也有 NSA2 mRNA 表达，在激光诱导的 CNV 动物模型的眼后段组织中，NSA2 mRNA 的转录增强。进一步进行冰冻切片免疫荧光染色，见图 4、5，显示 CNV 组眼后段 NSA2 在 CNV、节细胞阳性表达，在眼底组织表达升高。绿色荧光与 DAPi 着染的细胞核重合，与 zhang 等人报道的相符，再次证实了 NSA2 定位于胞核。我们可以推测核蛋白 NSA2 在 CNV 组织及病理状态下的节细胞中有重要的生物学作用。

NSA2 位于细胞核的核仁上，参与核糖体大亚基前体构成，与核糖体成熟相关，调节增殖细胞顺利从 G_1 期过渡到 S 期[4]。NSA2 又被称为标准的转化生长因子 β（Transforming growth factor β，TGF-β）可诱导核蛋白，受 TGF-β 正向调节[5]。有研究表明 TGF-β 对 CNV 发生有重要促进作用[6]。TGF-β 可以诱导多种细胞表达多种丝裂原，包括上调 RPE 细胞和脉络膜成纤维细胞表达 VEGF[7,8]。NSA2 可能是间接受 TGF-β 调控，在由 TGF-β 诱导的多种丝裂原的作用下，表达升高，促进核糖体成熟，增加某些细胞蛋白质分子的合成，促进CNV 中的细胞分裂增殖。

巩膜脉络膜组织主要由血管内皮细胞构成，为可再生性细胞，在丝裂原的刺激下可分裂增殖，长出病理性新生血管膜，细胞 NSA2 阳性率增加可能与细胞增殖有关。节细胞属于永久性细胞，但是同样可以对某些丝裂原刺激产生应答反应，如血管内皮细胞生长因子[9]、生长激素[10]可以增加节细胞的存活能力。在 CNV 组中的节细胞 NSA2 表达强阳性，与增殖无关，可能也是对某些细胞因子的应答反应，可能与增强节细胞在病理状态下的存活能力相关。

细胞中的分子信号通路是极其复杂的网络状结构，NSA2 在真核细胞中的研究目前还不多，作为一个具有促细胞增殖作用的核蛋白是怎样和其他丝裂原如 TGF-β、VEGF 联系在一起的，在不同组织来源细胞上的表达情况怎样以及具体能发挥一些什么功能作用，对 CNV 有什么影响都还需要进一步的深入研究证明。总之，实验首次初步探明了 NSA2 在激光诱导的 CNV 动物模型眼后段表达增强，在 CNV 上以及 CNV 附近节细胞上的表达呈阳性，提示 NSA2 参与了 CNV病变过程，可能与 CNV 病变相关联，推测可能对 CNV 眼底组织中细胞的分裂增殖、节细胞的存活有生物学意义，为深入研究 CNV 的发生机制及 CNV 病理发生过程中节细胞的存活调节提供了新的理论依据。

参　考　文　献

[1]　Li Y，Xu L，Jonas J B，et al.Prevalence of age-related maculopathy in the adult population in China：the Beijing eye study[J].Am J Ophthalmol，2006，142(5)：788-793.

[2]　罗中伶，陈国平，唐仁泓.长沙市机关人员年龄相关性黄斑变性患病率调查[J].眼科研究，2008，26(11)：822-823.

[3]　Zou H D，Zhang X，Xu X，et al.Prevalence study of age-related macular degeneration in Caojiadu blocks，Shanghai[J].Zhonghua Yan Ke Za Zhi，2005，41(1)：15-19.

[4]　Zhang H，Ma X，Shi T，et al.NSA2，a novel nucleolus protein regulates cell proliferation and cell cycle[J].Biochem Biophys Res Commun，2010，391(1)：651-658.

[5]　Lebreton A，Saveanu C，Decourty L，et al.Nsa2 is an unstable，conserved factor required for the maturation of 27 SB pre-rRNAs[J].J Biol Chem，2006，281(37)：27099-27108.

[6]　Schlingemann R O.Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration[J].Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol，2004，242(1)：91-101.

[7]　Bian Z M，Elner S G，Elner V M.Regulation of VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells[J].Exp Eye Res，2007，84(5)：812-822.

[8]　Nagineni C N，Samuel W，Nagineni S，et al.Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells：involvement of mitogen-activated protein kinases[J].J Cell Physiol，2003，197(3)：453-462.

[9]　Nishijima K，Ng Y S，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[J].Am J Pathol，2007，171(1)：53-67.

[10]　Sanders E J，Parker E，Harvey S.Growth hormone-mediated survival of embryonic retinal ganglion cells：signaling mechanisms[J].Gen Comp Endocrinol，2008，156(3)：613-621.

（责任编辑：冉明会）