

引文格式: 许琴, 金涛, 林素香, 王雅丽, 肖煜晨. CD59a 在激光诱导小鼠脉络膜新生血管形成中的作用 [J]. 眼科新进展, 2014, 34 (4): 330-332. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0089

【实验研究】

CD59a 在激光诱导小鼠脉络膜新生血管形成中的作用[△]

许琴 金涛 林素香 王雅丽 肖煜晨

作者简介: 许琴, 女, 1966 年出生, 江苏人, 硕士, 副教授。研究方向: 补体与年龄相关性黄斑病变。E-mail: 1256294095@qq.com

About XU Qin: Female, born in 1966. Associate professor. E-mail: 1256294095@qq.com

收稿日期: 2013-11-26

修回日期: 2014-01-12

本文编辑: 董建军

△基金项目: 珠海市科技局基金 (编号: 2012D0401990022)

作者单位: 519000 广东省珠海市, 珠海市第二人民医院

通讯作者: 肖煜晨, E-mail: 15190933845@qq.com

Received date: Nov 26, 2013

Accepted date: Jan 12, 2014

Foundation item: Science and Technology Support Project of Zhuhai City (No: 2012D0401990022)

From the Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Zhuhai, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Responsible author: XIAO Yu-Chen, E-mail: 15190933845@qq.com

Role of CD59a in laser-induced choroidal neovascularization

XU Qin, JIN Tao, LIN Su-Xiang, WANG Ya-Li, XIAO Yu-Chen

【Key words】 CD59a; choroidal neovascularization; macular degeneration

【Abstract】 **Objective** To study the role of complement CD59a in laser-induced choroidal neovascularization (CNV). **Methods** Experiments in three groups: C57BL/6 mice control group, CD59a (-/-) mice group, rsCD59a-FC pretreatment mice group. CNV was induced by laser photocoagulation with the krypton red laser, the incidence of epithelium-choroid-sclera CNV were determined by confocal microscopy. RPE-choroid-scleral flat mounts were stained for membrane attack complex (MAC), and RT-PCR analysis was used to examine the expression of CD59a mRNA. **Results** The expressions of CD59a mRNA at postoperative 3 days, 5 days decreased 60% and 30% in C57BL/6 mice control group, which in CD59a (-/-) mice group and rsCD59a-FC pretreatment mice group unchanged. A few of MAC deposition was observed in CD59a (-/-) mice group, little was in C57BL/6 mice control group, and no MAC staining was observed in rsCD59a-FC pretreatment mice group. At postoperative 5 days, little CNV were induced in C57/BL6 mice group, many in CD59a (-/-) mice group, and no in CNV were induced in rsCD59a-FC pretreatment mice group. **Conclusion** MAC formation plays a central role in the laser-induced CNV, and CD59a plays a crucial role in regulating complement activation that driving the development of laser-induced CNV in mice. Administration of rsCD59a-Fc may provide a novel therapeutic alternative to current treatment.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (4): 330-332]

【关键词】 CD59a; 脉络膜新生血管; 黄斑变性

【摘要】 目的 探讨补体调节蛋白 CD59a 在激光诱导小鼠脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成中的作用。方法 实验分 3 组: C57BL/6 小鼠对照组、CD59a (-/-) 小鼠组、rsCD59a-FC 预处理小鼠组。氩红激光光凝诱导小鼠 CNV 模型, 观察上皮-脉络膜-巩膜复合物 CNV 的发生率; 免疫组化检测膜攻击复合物沉积; RT-PCR 检测 CD59a mRNA 表达。结果 C57BL/6 小鼠对照组在光凝后第 3 天、第 5 天见 CD59a mRNA 表达下调, 分别为 60%、30%。CD59a (-/-) 小鼠组、rsCD59a-FC 预处理小鼠组在光凝后第 3 天、第 5 天未见 CD59a mRNA 表达下调。C57BL/6 小鼠见少量膜攻击复合物沉积、CD59a (-/-) 小鼠见大量膜攻击复合物沉积、rsCD59a-FC 预处理组未见膜攻击复合物沉积。光凝后第 5 天, C57BL/6 小鼠见少量 CNV 生成; CD59a (-/-) 小鼠见大量 CNV 形成; rsCD59a-FC 预处理小鼠未见 CNV 形成。结论 激光诱导小鼠 CNV 形成过程中, 膜攻击复合物起核心作用; CD59a 调节补体激活, rsCD59a-FC 通过阻断 MAC 的沉积阻断小鼠 CNV 的形成; rsCD59a-FC 将成为治疗 AMD 疾病的又一策略。

[眼科新进展, 2014, 34 (4): 330-332]

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是导致 55 岁以上患者失明的常见原因。虽然干性 AMD 更为普遍, 但灾难性的视觉丧失常与湿性 AMD 相关, 尤其是并发症脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 的发生^[1-8]。用激光诱导小鼠 CNV 模型进行研究发现, 补体的存在和激活是 CNV 发展的必要条件, 补体激活与补体调节蛋白 CD59 紧密相关^[9]。CD59 通

过阻断膜攻击复合物 (membrane attack complex, MAC) 的形成阻断补体过度活化^[10], 保护自体组织远离损害。CD59 在这个模型中的作用仍有待确定。小鼠 CD59 两个亚基因分别为 CD59a 和 CD59b。由于 CD59a 表达广泛, 而 CD59b 只在睾丸中表达^[10]。因此本研究只探讨 CD59a 在激光诱导小鼠 CNV 发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 聚焦显微镜 LSM510 (德国, Carl Zeiss)、Image-ProPlus 图像分析系统 5.0 (美国, Media Cybernetics); 电泳仪 (美国, Bio-Rad)。FITC-葡聚糖、抗羊 CY3-mAb 特定抗 Elastin 抗体 (美国, Sigma-Aldrich); 环喷托酯、复方托品酰胺、氯胺酮、甲苯噻嗪、羊抗鼠 C3IgG 片段和抗羊 IgG 抗体 (美国, Sigma-Aldrich)。RT-PCR 检测试剂盒 (美国, Applied Biosystems), SV Total RNA 提取试剂盒 (美国, Applied Biosystems), rsCD59a-FC。

1.2 实验动物与分组 雄性小鼠 39 只 (4~6 周龄; 购自美国 Jackson 实验室), 其中 C57BL/6 小鼠对照组 21 只; CD59a (-/-) 小鼠组 9 只; rsCD59a-FC 预处理小鼠组 9 只。

1.3 方法

1.3.1 补体的溶血活性 CH50 检测 分别收集腹腔注射 rsCD59a-FC ($n=3$) 及腹腔注射 PBS 24 h 后 ($n=3$) 小鼠腹腔静脉血, 按试剂盒要求检测 CH50。

1.3.2 CNV 模型的建立 各组小鼠左眼散瞳麻醉后, 在视神经周围距视盘 1.5~2.0 PD 处, 氦红激光光凝视网膜 (氦红激光波长为 659 nm, 光斑直径 50 μm , 曝光时间 0.05 s, 输出功率为 250 mW), 每眼等距离光凝 5~8 个点^[3,5-6]。rsCD59a-FC 预处理组激光光凝前 24 h 腹腔注射 rsCD59a-FC 每只小鼠 50 μg ^[6], 余组不作处理。

1.3.3 CNV 观察 激光光凝后第 5 天, 每组随机选择 3 只小鼠, 麻醉后用 1 mL 含 50 mg 荧光标记 FITC-Dextran PBS (pH=7.3) 灌注心脏 1 min 处死, 摘下左眼, 体积分数 10% 磷酸盐缓冲福尔马林固定, 解剖显微镜下去除角膜、晶状体、玻璃体, 将 RPE-脉

络膜-巩膜复合体放射状切开, 用 mAb 抗 elastin^[3,5-6] 染色弹力纤维及二抗 Anti-goatCY3 标记 CNV。在共聚焦显微镜下观察 CNV 的发生率。CNV 复合物大小用 Image-Pro Plus 图像分析系统进行分析。如绿色面积 <3% 激光斑面积表示无 CNV 形成, 为阴性, 否则为阳性^[3,5-6]。

1.3.4 MAC 的免疫组织化学检测 每组随机选择 3 只小鼠于光凝后 24 h 处死, 用多克隆抗体和 Cy3 结合的抗羊 IgG 1:200 稀释标记 RPE-脉络膜-巩膜复合体的 MAC, 显微镜下观察。

1.3.5 RT-PCR 检测 CD59a mRNA 表达 C57BL/6 小鼠于光凝前及光凝后 1 d、3 d、5 d、7 d (各时间点 $n=3$), 麻醉处死后取左眼, SV Total RNA 试剂盒提取总 RNA, 0.2 μg RNA 检测 CD59a mRNA 水平。目的基因引物序列: β -actin (74 bp) 上游引物: 5'-GCC ACC AGT TCG CCA TGG ATG A-3', 下游引物: 5'-GTC AGG CAG CTC ATA GCT CTT C-3'; CD59 (CD59a: 204 bp、CD59b: 237 bp) 正向 5'-GAT TCC TGT CTC-3'。

1.4 统计学处理 数据应用 SPSS13.0 统计软件进行处理, 组间比较采用 t 检验, 两组以上的数据比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补体 CH50 检测 rsCD59a-FC 预处理小鼠组与注射 PBS 的对照组相比, 注射 rsCD59a-FC 小鼠 24 h 后 CH50 总溶血活性减少 70%。

2.2 激光诱导 CNV 复合物 光凝后第 5 天, CD59a (-/-) 小鼠出现大量新生血管 CNV 形成; C57BL/6 小鼠出现少量新生血管 CNV 形成; rsCD59a-FC 预处理小鼠未见 CNV 形成 (图 1)。

Figure 1 CNV in each group at postoperative 5 days. A: A large number of CNV were formed in CD59a (-/-) mice (CNV complex was green, Bruch's membrane and RPE was red); B: Few CNV were formed in C57BL/6 mice; C: No CNV was formed in rsCD59a-FC pretreatment mice 激光光凝第 5 天, 各组小鼠 CNV 情况。A: CD59a (-/-) 小鼠见大量 CNV 生成 (CNV 复合物显绿色, Bruch 膜及 RPE 显红色); B: C57BL/6 小鼠见少量 CNV 生成; C: rsCD59a-FC 预处理小鼠未见 CNV 生长

2.3 新生血管复合物区域 MAC 的沉积 光凝后 24 h 检测 RPE-脉络膜-巩膜复合体铺片 MAC, CD59a (-/-) 小鼠见大量 MAC 强阳性染色; C57BL/6 小鼠见少量 MAC 阳性染色; rsCD59a-FC 预处理小鼠未见 MAC 阳性染色 (图 2)。

2.4 RT-PCR 检测 CD59a mRNA 表达 观察 C57BL/6 小鼠光凝诱导后 1 d、3 d、5 d、7 d CD59a mRNA 表

达, 激光光凝后第 3 天、第 5 天 CD59a mRNA 表达下调 (图 3), 分别为 60%、30%。而 CD59a (-/-) 小鼠组、rsCD59a-F 预处理小鼠组光凝后第 3 天、第 5 天未见 CD59a mRNA 表达下调。

3 讨论

AMD 是老年人致盲的主要眼病之一。临床上将

Figure 2 MAC at postoperative 24 hours in each group. A: A large number of MAC positive staining was observed in CD59a (-/-) mice; B: MAC positive staining in C57BL/6 mice; C: No staining for MAC in rsCD59a-FC pretreatment mice 光凝后 24 h, 各组小鼠 MAC 情况。A: CD59a (-/-) 小鼠见大量 MAC 强阳性染色; B: C57BL/6 小鼠对照组见 MAC 阳性染色 (红色); C: rsCD59a-FC 预处理小鼠组, 未见 MAC 阳性染色

Figure 3 Expression of CD59a mRNA in C57BL/6 control group at pre-operation and postoperative 1 day, 3 day, 5 days and 7 days 光凝前及光凝诱导后第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天 C57BL/6 小鼠对照组 CD59a mRNA 表达情况

AMD 分为干性和湿性两大类, 湿性 AMD 以 CNV 为主要特征。CNV 穿过 Bruch 膜进入视网膜下, 导致视网膜脱离, 引发不可逆突发性中心视力丧失。湿性 AMD 是导致 55 岁以上的人视力不可逆丧失的主要原因^[1-6]。

正常情况下 MAC 会自发地少量沉积在组织, 而在病理条件下补体 MAC 的大量沉积促使成纤维细胞生长因子和 VEGF 释放增加^[8]。研究表明 MAC 的形成通过替代途径激活补体, MAC 的沉积是激光诱导小鼠 CNV 发生发展的核心环节^[6,10]。补体调节蛋白 CD59^[9]与补体激活紧密相关。Bora 等^[6]眼内补体 CD59 调节 MAC 形成, MAC 大量沉积引起 RPE-Bruch 膜-脉络膜毛细血管变性, 脉络膜毛细血管进入 RPE 层下, 导致 CNV 生成, 引起 AMD。但补体调节蛋白 CD59 在激光诱导 CNV 中的作用不明。

我们用激光光凝 C57BL/6 小鼠左眼诱导 CNV 形成, 在激光光凝第 3 天、第 5 天, 小鼠视网膜-脉络膜-巩膜 CD59a mRNA 表达下调, 见 MAC 沉积, 这些低表达的 CD59a 促进补体激活, 导致 MAC 沉积增加, 促进 CNV 生成, 光凝后第 5 天见轻微 CNV 形成。有报道 CD59 通过阻断 MAC 的形成, 阻断补体过度活化^[9-10], 从而保护自体组织远离损害。由于调节蛋白 CD59a 在体内控制补体激活和补体 MAC 的形成, 故我们用 CD59a 基因缺失小鼠^[9-10], 研究 CD59a 基因缺失时小鼠病程的严重程度。在这项研究中, 我们发现: 与 C57BL/6 小鼠对照组相比, CD59a 缺失小鼠由于 CD59a 基因缺陷缺乏 CD59a, 从而导致补体过度活化形成更多的 MAC^[10], 造成大量 MAC 沉积在视网膜-脉络膜-巩膜, 第 5 天形成大量 CNV 复合体, 以及在稍后的时间形成更严重的 CNV。

为了进一步分析 CD59a 在 CNV 的作用, 我们在激光光凝小鼠左眼前注射 rsCD59a-FC 补体抑制剂, 血清溶血活性 CH50 证实当小鼠注射 rsCD59a-FC 补体抑制剂后, 补体活性降低 70% (与对照组相比)。研究发现 rsCD59a-FC 预处理小鼠组, 光凝后 24 h 小鼠视网膜-脉络膜-巩膜未见 MAC 沉积, 光凝第 5 天亦未见 CNV 形成, 由此推断 rsCD59a-FC 抑制剂通过阻断 MAC 形成从而阻断 CNV 形成。进一步证实了我们先前的结果^[7-8]。MAC 是形成这种小鼠 CNV 模型的主要介质, 由此我们提出抑制 MAC 形成可能是治疗 CNV 的新策略或新方案。不久的将来, 补体抑制剂将用于 CNV 的防治和治疗, 会成为治疗 AMD 的新策略。

参考文献

- Yates JR, Moore AT. Genetic susceptibility to age related macular degeneration [J]. *J Med Genet*, 2000, 37 (2): 83-87.
- Husain D, Ambati B, Admanis AP, Miller JW. Mechanisms of age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmol Clin North Am*, 2002, 15 (1): 87-91.
- Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, Wang Y, et al. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization [J]. *J Immunol*, 2005, 174 (1): 491-497.
- Bora PS, Hu Z, Tezel TH, Sohn JH, Kang SG, Cruz JM, et al. Immunotherapy for choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model simulating exudative (wet) macular degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (5): 2679-2684.
- Bora PS, Kaliappan S, Xu Q, Kumar S, Wang Y, Kaplan HJ. Alcohol linked to enhanced angiogenesis in rat model of choroidal neovascularization [J]. *FEBS J*, 2006, 273 (7): 1403-1414.
- Bora NS, Kaliappan S, Jha P, Xu Q, Sohn JH, Dhaulakhandi DB, et al. Complement activation via alternative pathway is critical in the development of laser-induced choroidal neovascularization: role of factor B and factor H [J]. *J Immunol*, 2006, 177 (3): 1872-1878.
- 许琴, 肖煜晨. 激光诱导小鼠脉络膜新生血管中补体 C3 的作用 [J]. *眼科新进展*, 2011, 31 (8): 734-736.
- 许琴, 黄亮, 林素香, 郑水华, 肖煜晨. 激光诱导小鼠脉络膜新生血管中膜攻击物与血管生长因子的表达 [J]. *眼科新进展*, 2013, 33 (8): 729-732.
- Holt DS, Botto M, Bygrave AE, Hanna SM, Walport MJ, Morgan BP. Targeted deletion of the CD59 gene causes spontaneous intravascular hemolysis and hemoglobinuria [J]. *Blood*, 2001, 98 (2): 442-449.
- Baalasubramanian S, Harris CL, Donev RM, Mizuno M, Omidvar N, Song WC, et al. CD59a is the primary regulator of membrane attack complex assembly in the mouse [J]. *J Immunol*, 2004, 173 (6): 3684-3692.