

# CCN1 在氧诱导小鼠视网膜新生血管形成中的表达及意义

底煜<sup>1</sup>, 张轶欧<sup>2</sup>, 杨颺<sup>1</sup>, 陈晓隆<sup>1</sup>

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 81371045);辽宁省科技计划项目基金资助(No. 2010225034)

作者单位:<sup>1</sup>(110004)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属盛京医院眼科;<sup>2</sup>(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学研究生院

作者简介:底煜,毕业于中国医科大学,博士,讲师,研究方向:眼底病、眼外伤。

通讯作者:陈晓隆,教授,博士,研究方向:眼底病、眼外伤。  
chenxl@sj-hospital.org

收稿日期:2014-07-20 修回日期:2014-11-18

## Expression and significance of CCN1 in oxygen-induced retinal neovascularization of mice

Yu Di<sup>1</sup>, Yi-Ou Zhang<sup>2</sup>, Yang Yang<sup>1</sup>, Xiao-Long Chen<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81371045); Science and Technology Project of Liaoning Province (No. 2010225034)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China;

<sup>2</sup>Graduate School of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Xiao-Long Chen. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chenxl@sj-hospital.org

Received:2014-07-20 Accepted:2014-11-18

## Abstract

• **AIM:** To explore the expression and significance of cysteine-rich 61 (CCN1/Cyr61) in oxygen-induced retinal neovascularization (RNV) of mice and study the inhibition effect of CCN1 specific siRNA on RNV.

• **METHODS:** Two hundred healthy C57BL/6J mice were chosen and randomly divided into control group, hyperxia group, hyperxia control group and CCN1 treated group, with 50 mice in each group. The hyperxia control group was treated with vector plasmids by intravitreal injection. The CCN1 treated group received CCN1 siRNA recombinant plasmids by intravitreal injection. Adenosine diphosphate-ase (ADPase) stained retina flat-mounts was performed to assess the retinal vascular profiles, HE staining was applied to count the number of vascular endothelial cell nuclei breaking through the internal limiting membrane, protein and mRNA level expression of CCN1 were measured by immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR.

• **RESULTS:** There were large nonperfusion area and a large number of vascular endothelial cell nuclei breaking through the internal limiting membrane ( $25.25 \pm 1.26$ ;  $23.12 \pm 1.16$ ) in the hyperxia group and the hyperxia control group. Regions of nonperfusion and vascular endothelial cell nuclei ( $8.47 \pm 1.15$ ) were decreased in the CCN1 treated group compared to the hyperxia group and the hyperxia control group. Compared with the control group, there were high protein and mRNA expression of CCN1 in the hyperxia group and the hyperxia control group. The expression of CCN1 protein and mRNA were decreased in the CCN1 treated group compared with the hyperxia group and hyperxia control group (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** The abnormal expression of CCN1 has close relation with RNV. The development of RNV can be markedly inhibited by RNA interference targeting CCN1, which, we believe, will provide new molecular targets and a rationale for clinical developing new strategy for ROP therapy.

• **KEYWORDS:** retinal neovascularization; cysteine-rich 61; RNA interference; retinopathy of prematurity

**Citation:** Di Y, Zhang YO, Yang Y, et al. Expression and significance of CCN1 in oxygen-induced retinal neovascularization of mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(12):2131-2134

## 摘要

**目的:** 研究富含半胱氨酸蛋白 61 (CCN1/Cyr61) 在氧诱导小鼠视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 中的表达及意义, 探讨特异性抑制 CCN1 对 RNV 形成的抑制作用。

**方法:** 取 C57BL/6J 小鼠 200 只, 随机分为对照组、高氧组、高氧对照组和 CCN1 治疗组, 每组各 50 只。高氧对照组和 CCN1 治疗组分别玻璃体内注射空载体质粒和 CCN1 siRNA 表达质粒。ADP 酶视网膜铺片观察视网膜血管形态, HE 染色计数突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数, 免疫组织化学、Western blot 和 RT-PCR 法检测 CCN1 蛋白及 mRNA 的表达情况。

**结果:** 高氧组和高氧对照组视网膜可见大片无灌注区和大量突破内界膜的新生血管内皮细胞核 ( $25.25 \pm 1.26$  个;  $23.12 \pm 1.16$  个), CCN1 治疗组较高氧组和高氧对照组的无灌注区及新生血管内皮细胞核数 ( $8.47 \pm 1.15$  个) 明显减少。高氧组和高氧对照组较对照组相比, CCN1 蛋白及 mRNA 表达显著增高, CCN1 治疗组较高氧组和高氧对照组显著减弱, 均有统计学意义 (均为  $P < 0.05$ )。

**结论:** CCN1 的异常表达可能与 RNV 形成密切相关, 特异性抑制 CCN1 能有效抑制 RNV 的形成, 为预防和治疗 ROP 提供新的思路及对策。

**关键词:** 视网膜新生血管; 富含半胱氨酸蛋白 61; RNA 干扰; 早产儿视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.06

引用:底煜,张铁欧,杨颺,等.CCN1在氧诱导小鼠视网膜新生血管形成中的表达及意义.国际眼科杂志2014;14(12):2131-2134

## 0 引言

CCN1也即富含半胱氨酸蛋白61(cysteine-rich 61, Cyr61)是CCN蛋白家族第一个被克隆的成员,它是一种由生长因子诱导产生的富含半胱氨酸的即刻早期基因产物,广泛存在于多种组织器官<sup>[1]</sup>。CCN1在胚胎发育中起着促进细胞增殖、维持组织正常分化等重要作用,但其表达量随胚胎进入发育后期而逐渐减低。胚胎早期阶段的内皮细胞黏附和血管形成是CCN1同整合素 $\alpha_v\beta_3$ 相互作用产生的<sup>[2]</sup>;CCN1与内皮细胞表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合并激活其下游信号通路,从而促进细胞间的黏附与存活,参与生长因子诱导的促有丝分裂作用以及内皮微管的形成<sup>[3]</sup>。目前研究发现,CCN1在多种肿瘤的发病中起着重要的作用,其主要机制在于参与肿瘤内血管的生成,另外研究表明,CCN1的表达与肿瘤的恶性程度和预后相关<sup>[4-7]</sup>。而眼部新生血管性病变的血管生成过程与上述情况类似,但有关CCN1在眼部新生血管性疾病中的作用,目前研究还比较少。本实验通过氧诱导小鼠建立的早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)动物模型,观察CCN1在其视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)的表达情况,探讨特异性抑制CCN1对RNV形成的抑制作用,为预防和治疗ROP提供新的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 取鼠龄7d的健康C57BL/6J清洁级小鼠200只,中国医科大附属盛京医院实验动物中心提供。主要试剂:ADP酶购自美国Sigma公司;阳离子脂质体(Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, LF2000)购自Invitrogen公司;CCN1<sub>1072</sub>siRNA质粒(上海GenePharma)公司合成;正义链5'-GCA AGA AAU GCA GCA AGA CCA TT-3',反义链5'-UGG UCU UGC UGC AUU UCU UGC TT-3';兔抗人CCN1多克隆抗体购自英国Abcam公司;PCR试剂盒购自日本TaKaRa生物工程有限公司;PCR引物由上海英骏生物技术有限公司合成;SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及基因转染** 采用随机数字表法将小鼠分为对照组、高氧组、高氧对照组和CCN1治疗组,每组50只。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》。分别于小鼠出氧箱的前1d(鼠龄11d)进行基因转染,在手术显微镜下,自角膜缘后0.5mm处约40°角刺入连接33G针头的微量注射器,将1 $\mu$ L质粒-脂质体混合物(1 $\mu$ L 500ng/ $\mu$ L CCN1siRNA; 1 $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000)注入CCN1治疗组小鼠玻璃体腔内,同时高氧对照组注射空载体质粒-脂质体混合物。注射后立即放回氧箱,1d后(鼠龄12d)重新出氧箱。转染后观察小鼠观察眼部及全身情况。对照组和高氧组小鼠不作转染。每组的左眼作为实验眼,右眼未作任何处置,四组分别于17d处取材。

**1.2.2 ROP动物模型的建立** 参照Smith等<sup>[8]</sup>的方法,将鼠龄7d的健康C57BL/6J清洁级小鼠与哺乳母鼠一起置于氧浓度为75% $\pm$ 2%的密闭玻璃容器内,测氧仪监测并调控容器内氧浓度。所有动物保持室温23 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,每隔2d替换母鼠。室内采用日光灯照明,光照周期为12h/12h。在此高氧环境下饲养5d后回到正常空气环境中饲养。对照组持续饲养于正常空气环境下饲养。

**1.2.3 视网膜铺片观察视网膜血管形态** 视网膜铺片(ADP酶组织化学法):四组各取新生鼠10只,于鼠龄17d处死,进行视网膜铺片,以观察视网膜血管发育及增生情况。10%水合氯醛(0.3mL/100g)腹腔麻醉,左心室灌注4%多聚甲醛溶液约5min,立即摘除眼球、固定,去除眼前节,完整游离视网膜组织。然后将视网膜放射状切开4~5刀,经过漂洗、孵育、显色、甘油明胶封片,光学显微镜下观察拍照。

**1.2.4 HE染色计数突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数** 视网膜组织切片(HE染色法):四组各取新生鼠10只,于鼠龄17d处死,摘除眼球、固定,作6 $\mu$ m厚的连续切片,每只眼球选10片作石蜡切片的HE染色,用随机、双盲法光学显微镜下计数突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数。计数血管内皮细胞核时仅计数与内界膜有紧密联系的细胞核,不包括玻璃体腔内其他与内界膜无联系的血管内皮细胞核。

**1.2.5 免疫组织化学检测CCN1阳性细胞的积分光密度值** 从四组中各随机抽取10张未经染色的切片,按链霉素抗生物素蛋白-生物素复合物(SABC)法进行CCN1免疫组织化学检查。以PBS代替一抗作为阴性对照,二氨基联苯胺(DAB)显色。CCN1表达的阳性细胞为细胞浆或胞核内着淡黄色至棕褐色颗粒。图像分析:每张切片随机选取5个不连续的高倍视野(400倍),利用MetaMorph/ Evolution MP5.0/BX51进行灰度扫描,分别测定阳性细胞的积分光密度值(Integrated OD),取其平均值作为分析指标。

**1.2.6 Western blot检测CCN1蛋白的表达** 从四组中各随机抽取鼠龄17d小鼠15只麻醉处死后,收取小鼠视网膜组织,按照试剂盒说明书提取视网膜总蛋白。以1:10比例加入裂解缓冲液(2mmol/L EDTA, 10mmol/L EGTA, 4g/L NaF, 20mmol/L Tris-HCl, pH=7.5),匀浆机匀浆,4 $^{\circ}$ C 17000r/min离心1h,取上清并测定蛋白含量。把样品调成相同浓度,加入样品缓冲液,75g/L十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳转印至纤维素膜上,加碱性磷酸酶标记的二抗杂交,然后进行化学发光、显影和定影。采用 $\beta$ -actin作为内参照。结果用Chemi Imager 5500 V2.03图像分析系统进行扫描,Fluor Chen 2.0软件进行整合光密度(IDV)分析。

**1.2.7 RT-PCR检测CCN1 mRNA的表达** 从四组中各随机抽取鼠龄17d小鼠15只麻醉处死后,收取小鼠视网膜组织,按照试剂盒说明书提取视网膜总RNA。CCN1的引物序列:F:5'-AGACCCTGTGAATATAACTCCA-3', R:5'-AATGCGATTAATCATTGTTT-3',扩增产物为300bp; $\beta$ -actin为内参照,引物序列:F:5'-GAGAGGGAAATCG TGCGTGA-3', R:5'-GCCTAGAAGCATTGCGGTG-3',扩增产物为518bp。反应条件:预热95 $^{\circ}$ C 30s,二步法,95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 31s,50个循环。采用 $\beta$ -actin作为内参照,CCN1 mRNA的相对表达量为实验组目的基因表达量是



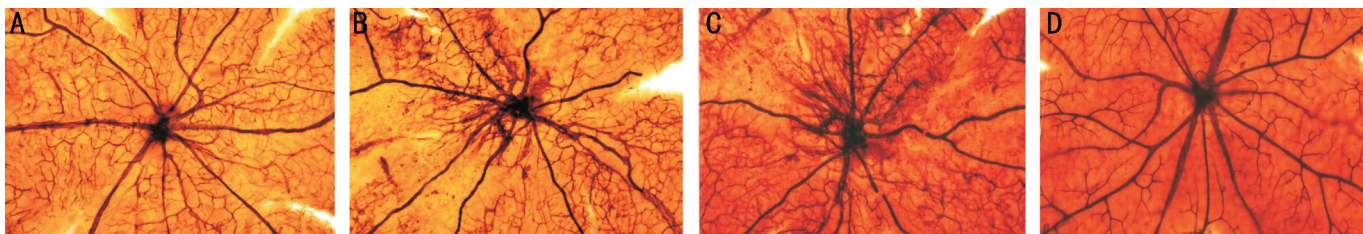


图1 17d小鼠视网膜血管铺片(ADP,×100) A:对照组;B:高氧组;C:高氧对照组;D:CCN1治疗组。

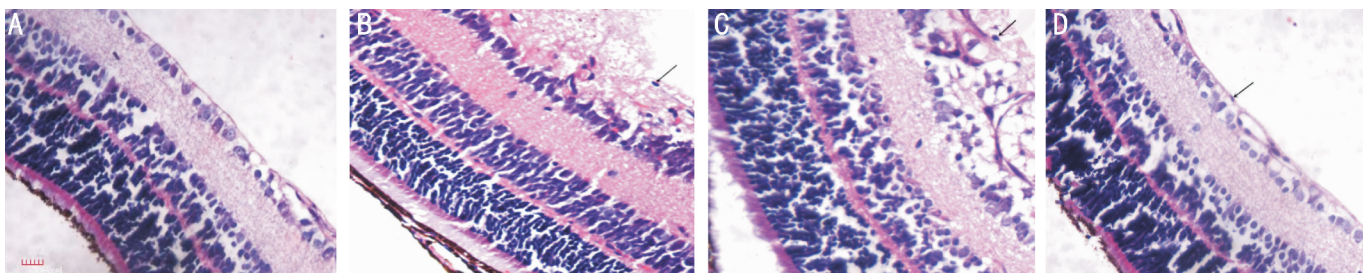


图2 鼠龄17d小鼠视网膜HE染色(×400,标尺:50μm;箭头表示突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核) A:对照组;B:高氧组;C:高氧对照组;D:CCN1治疗组。

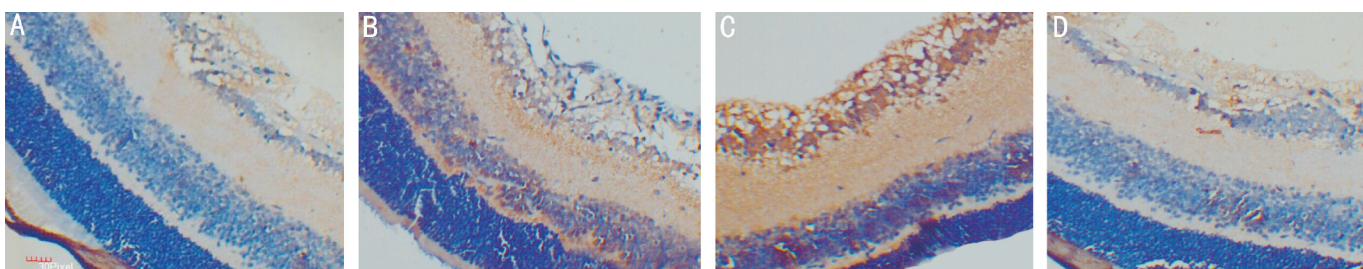


图3 免疫组化检测17d小鼠视网膜中CCN1蛋白的表达(×400,标尺:50μm) A:对照组;B:高氧组;C:高氧对照组;D:CCN1治疗组。

对照组的倍数,即 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 值,而 $\Delta\Delta ct = (ct_{\text{实验组目的基因}} - ct_{\text{实验组内参}}) - (ct_{\text{对照组目的基因}} - ct_{\text{对照组内参}})$ 。

统计学分析:采用SPSS 13.0软件包进行统计学分析。所有数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异用单因素方差分析(one-way ANOVA)检测,两两比较采用LSD- $t$ 法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 视网膜新生血管形态** 对照组P17小鼠视网膜血管基本成熟,自视盘发出的大血管向四周呈放射状均匀分布,管径较粗,分支良好,直至视网膜周边部,未见新生血管形成(图1A)。高氧组和高氧对照组P17小鼠自视盘发出的视网膜血管更加迂曲,不规则扩张,有大片无灌注区,大量新生血管形成,但这些新生血管网结构及分布极其紊乱,丧失了正常的放射状及多角形结构,而且周边毛细血管网广泛闭塞(图1B,C)。CCN1治疗组P17小鼠相比与高氧组和高氧对照组视盘周围无灌注区明显减少,血管迂曲及不规则扩张减轻,新生血管丛明显减少(图1D)。

**2.2 新生血管内皮细胞核计数** 对照组组织切片很少见到突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核,平均每个切面为 $5.35 \pm 1.78$ 个(图2A);而高氧组和高氧对照组则可见到大量突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核,平均每个切面分别为 $25.25 \pm 1.26$ 个(图2B), $23.12 \pm 1.16$ 个(图2C);CCN1治疗组较高氧组和高氧对照组的新生血管内皮细胞核明显减少,平均为 $8.47 \pm 1.15$ 个(图2D),差异均有统计学意义( $t = 7.56$ ,  $t = 7.53$ , 均为 $P < 0.05$ )。

**2.3 视网膜组织CCN1蛋白的表达** 对照组视网膜CCN1

蛋白呈弱阳性表达,主要定位于神经节细胞层和内丛状层(图3A);高氧组和高氧对照组表达增强,呈强阳性,主要定位于神经节细胞层、内丛状层、外丛状层和突破视网膜内界膜的新生血管(图3B,C);CCN1治疗组较高氧组表达明显减弱,主要定位于神经节细胞层和内丛状层(图3D)。

**2.4 视网膜组织CCN1蛋白的表达变化** Western blot检测四组小鼠视网膜CCN1蛋白表达(图4,5),各组间差异有统计学意义( $F = 2456.010$ ,  $P < 0.05$ )。对照组视网膜中有极微弱的CCN1蛋白表达,而高氧组和高氧对照组表达显著上调,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。高氧组和高氧对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。CCN1治疗组较高氧组表达下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),抑制效率为51.11%。

**2.5 视网膜组织CCN1 mRNA的表达变化** RT-PCR检测小鼠视网膜CCN1 mRNA表达,各组间差异有统计学意义( $F = 168.705$ ,  $P < 0.05$ )。正常组视网膜中CCN1 mRNA表达低,高氧组和高氧对照组表达上调,与正常组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。高氧组和高氧对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。CCN1治疗组较高氧组表达下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),抑制效率为38.23%,见图6。

## 3 讨论

视网膜新生血管性疾病,如早产儿视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变和视网膜静脉阻塞等主要的致盲性眼病,发病的病理基础就是在缺血、缺氧条件的刺激下,视网膜组织释放多种血管生成因子,导致新生血管形成<sup>[9,10]</sup>,但其发生的分子机制仍不十分清楚。

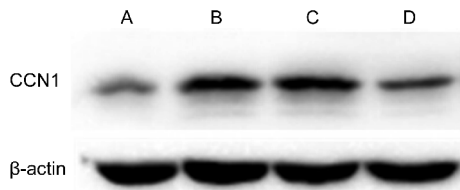


图4 Western blot 检测 17d 小鼠视网膜中 CCN1 蛋白的表达  
 A: 对照组; B: 高氧组; C: 高氧对照组; D: CCN1 治疗组。

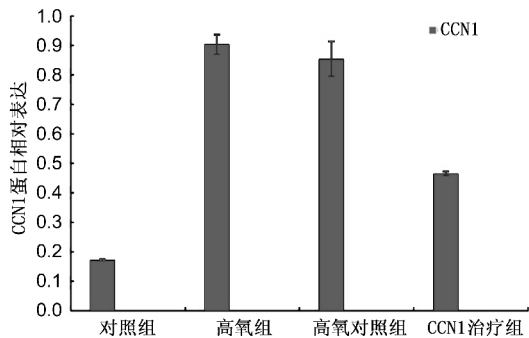


图5 柱状图显示 17d 小鼠视网膜 CCN1 蛋白相对表达情况。

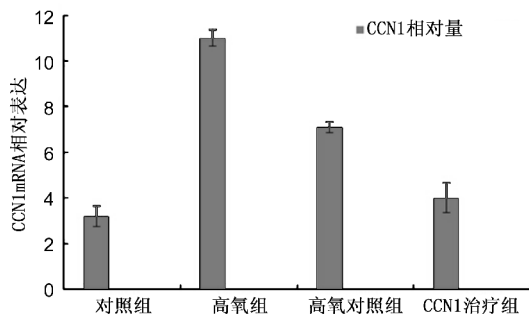


图6 RT-PCR 检测小鼠视网膜中 CCN1 mRNA 相对表达情况。

CCN 家族是一组分泌性糖蛋白,与细胞外基质相互作用,调节细胞之间黏附和细胞移行,促进有丝分裂发生及细胞分化;同时它们在新生血管形成,肿瘤复发及转移,以及纤维变性等方面也起着重要的调节作用<sup>[11,12]</sup>。研究报道,CCN1 在动脉粥样硬化<sup>[13]</sup>、肿瘤形成<sup>[14]</sup>以及眼内血管形成<sup>[15,16]</sup>等多种病理过程中发挥重要作用。

本实验免疫组化染色、Western blot 和 RT-PCR 结果显示,由于缺氧,高氧组小鼠视网膜中 CCN1 蛋白和 mRNA 的表达与正常组相比较明显上调,说明 CCN1 与小鼠 RNV 的形成密切相关。如果采用某种方法抑制 CCN1 的表达,是否能够达到抑制 RNV 形成的目的呢? 本实验利用氧诱导小鼠进行活体实验,为确保质粒在 CCN1 高表达前转染视网膜,我们选择在小鼠出氧箱前 1d 注射 CCN1 siRNA<sup>[17]</sup>。研究结果发现,转染 CCN1 siRNA 后,CCN1 治疗组较高氧组和高氧对照组比较,无灌注区明显减少,血管迂曲及不规则扩张减轻,新生血管丛明显减少,CCN1 蛋白及 mRNA 的表达水平显著下调,但其表达仍高于对照组,差异有统计学意义。这从形态学及分子生物学方面证明了 CCN1 小片段干扰性 RNA 对 RNV 的抑制作用,说明 CCN1 siRNA 可以抑制 CCN1 的表达,但不能完全抑制。可能与下列因素有关:(1) RNV 的形成不仅与 CCN1 有关,也与其他一些因子有关。(2) 推测可能与干扰质粒的表达载体有关,不同的表达载体,其转染的效率不同,因此

需通过实验来证实,不同载体的转染效率。(3) 可能与质粒的数量有关,CCN1 siRNA 剂量过小起不到有效抑制 RNV 的作用,过大则可能会有明显的副作用等,这需要大量的实验证实。

本实验揭示了 CCN1 参与了视网膜新生血管的生成,在视网膜新生血管形成和增殖中发挥一定作用,利于进一步探讨视网膜新生血管的病理演变机制。CCN1 小片段干扰性 RNA 对缺血、缺氧诱导的 RNV 的抑制效果及可能的机制,为最终过渡到临床基因治疗 ROP 打下了坚实的理论和实践基础。

参考文献

- 1 Pasmant E, Ortonne N, Rittie L, et al. Differential expression of CCN1/CYR61, CCN3/NOV, CCN4/WISP1, and CCN5/WISP2 in neurofibromatosis type1 tumorigenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69(1):60-69
- 2 徐宁,贺其图,韩轩茂. CCN 蛋白(Cyr61/CTGF)与肿瘤血管新生的研究进展. *肿瘤防治研究* 2010;37(4):477-479
- 3 Long QZ, Zhou M, Liu XG, et al. Interaction of CCN1 with  $\alpha v \beta 3$  integrin induces P-glycoprotein and confers vinblastine resistance in renal cell carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 2013;24(8):810-817
- 4 吕建发,邹友成,张纯伟,等. Cyr61 和 WISP-3 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义. *中国肺癌杂志* 2010;13(12):1122-1126
- 5 D'Antonio KB, Toubaji A, Albadine R, et al. Extracellular matrix associated protein CYR61 is linked to prostate cancer development. *J Urol* 2010;183(4):1604-1610
- 6 Watari H, Xiong Y, Hassan MK, et al. Cyr61, a member of ccn (connective tissue growth factor/cysteine - rich 61/nephroblastoma overexpressed) family, predicts survival of patients with endometrial cancer of endometrioid subtype. *Gynecol Oncol* 2009;112(1):229-234
- 7 Leask A. Sonic advance: CCN1 regulates sonic hedgehog in pancreatic cancer. *J Cell Commun Signal* 2013;7(1):61-62
- 8 Smith LE, Wesolowski E, Mclellan A, et al. Oxygen - induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(1):101-111
- 9 范海燕,倪卫杰,施彩虹,等. 17 $\beta$ -雌二醇预防早产儿视网膜病变的动物实验研究. *国际眼科杂志* 2014;14(3):407-410
- 10 朱国青,刘秀香. 氧诱导早产儿视网膜病变的机制研究进展. *中华临床医师杂志(电子版)* 2013;7(13):6060-6062
- 11 Chaqour B. New insights into the function of the matricellular CCN1: an emerging target in proliferative retinopathies. *J Ophthalmic Vis Res* 2013;8(1):77-82
- 12 Borkham-Kamphorst E, Schaffrath C, Van de Leur E, et al. The anti-fibrotic effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF- $\beta$  signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(5):902-914
- 13 Mo FE, Lau LF. The matricellular protein CCN1 is essential for cardiac development. *Circ Res* 2006;99(9):961-969
- 14 Bar A, Dorfman SE, Fischer P, et al. The pro-angiogenic factor CCN1 enhances the re-endothelialization of biological vascularized matrices *in vitro*. *Cardiovasc Res* 2010;85(4):806-813
- 15 Yan L, Chaqour B. Cysteine-rich protein 61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2) at the crosshairs of ocular neovascular and fibrovascular disease therapy. *J Cell Commun Signal* 2013;7(4):253-263
- 16 Choi J, Lin A, Shrier E, et al. Degradome products of the matricellular protein CCN1 as modulators of pathological angiogenesis in the retina. *J Biol Chem* 2013;288(32):23075-23089
- 17 Masuela I, Matsuo T, Yasuda T, et al. Gene transfer with liposomes to the intraocular tissues by different routes of administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(9):1914-1920