

低氧对小鼠 RGC-5 细胞中膜联蛋白 A2 表达的抑制作用

闫琳 杨侠 王龙梅 董晓光 徐海峰

【摘要】 **背景** 研究已证实,缺氧是诱导视网膜新生血管形成的主要因素,与多种眼科病变的发生有关,且低氧与视网膜神经节细胞(RGCs)的变性也密切相关,但对视网膜神经组织病变的研究较少。**目的** 观察低氧对 RGCs 中 ANXA2 表达的影响,探讨低氧对 RGCs 的损伤机制。**方法** 用含体积分数 10% 胎牛血清的高糖培养液对小鼠 RGC-5 细胞株进行培养,采用免疫荧光技术检测 RGCs 特异表面抗原 Thy-1 的表达。分别采用含 CoCl_2 终质量浓度为 50、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液培养 RGC-5 细胞,并分别于培养后 12、24、48 h 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测细胞吸光度(A)值,以不含 CoCl_2 培养液培养 RGC-5 细胞作为正常对照。以含终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 培养液培养 RGC-5 细胞以建立低氧细胞模型,将模型细胞分为低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组、低氧 24 h 组,正常培养的细胞作为正常对照组。各组细胞行 Hoechst 33342 荧光染色,观察 RGC-5 细胞核形态的变化;采用实时定量逆转录 PCR 检测各组细胞中 ANXA2 mRNA 的相对表达量;采用 Western blot 法检测细胞中 ANXA2 蛋白的相对表达量;采用免疫荧光法观察 ANXA2 在细胞中表达的分布。**结果** 体外培养的 RGC-5 细胞呈梭形或多边形,Thy-1 反应阳性。与正常对照组比较,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组各时间点细胞 A 值的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);200 和 300 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组各时间点细胞 A 值均明显低于正常对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。正常对照组细胞核 Hoechst 33342 染色未见致密的亮蓝色荧光,低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组和低氧 24 h 组细胞核内均可见致密的亮蓝色强荧光。低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组和低氧 24 h 组 RGC-5 细胞中 ANXA2 mRNA 的相对表达量分别为 0.80 ± 0.14 、 0.67 ± 0.33 、 0.49 ± 0.17 、 0.39 ± 0.02 ,均明显低于正常对照组,总体比较差异有统计学意义($F = 434.354, P = 0.000$)。低氧 3 h、6 h、12 h、24 h 组 RGC-5 细胞中 ANXA2 蛋白的相对表达量分别为 0.5526 ± 0.0123 、 0.4259 ± 0.0334 、 0.3449 ± 0.0178 和 0.3827 ± 0.0221 ,明显低于正常对照组的 0.6021 ± 0.0014 ,总体比较差异有统计学意义($F = 3.057, P = 0.000$)。免疫荧光结果显示 ANXA2 蛋白主要在 RGC-5 细胞核中表达,少量表达于细胞膜及细胞质中,各低氧组细胞质中 ANXA2 蛋白荧光弱于正常对照组。**结论** 低氧条件下小鼠 RGC-5 细胞中 ANXA2 表达水平明显下调,可能与高糖环境下 RGCs 凋亡有关。

【关键词】 膜联蛋白 A2; 视网膜神经节细胞; 缺氧; 细胞凋亡

Restrain of hypoxia on the expression of annexin A2 in mouse RGC-5 cells Yan Lin, Yang Xia, Wang Longmei, Dong Xiaoguang, Xu Haifeng. Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Xu Haifeng, Email: chxf@126.com

[Abstract] **Background** Hypoxia is the main factor of retinal neovascularization and is closely associated with retinal ganglial cells (RGCs) degeneration. However, the study of retinal neural tissue lesions is rare.

Objective This study was to investigate the influence of hypoxia environment on the expression of annexin A2 (ANXA2) in mouse RGC-5 cells and explore the mechanism of RGCs damage induced by hypoxia. **Methods** Immortalized mouse RGC-5 cells were cultured in high glucose DMEM with 10% fetal bovine serum. The cells were identified by detecting the expression of Thy-1, a specific biomarker of RGCs. CoCl_2 was added into the medium at the final concentrations of 50, 100, 200 and 300 $\mu\text{mol/L}$, and the cells without CoCl_2 served as the control group. Cell viability (absorbance) was assayed by cell counting kit-8 (CCK-8) method in 12, 24 and 48 hours after addition of

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.12.006

基金项目: 山东省自然科学基金项目(2011ZRC03040)

作者单位: 266071 青岛, 山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室 [闫琳(现在烟台爱尔眼科医院)、杨侠、董晓光、徐海峰]; 276800 日照市中医院(王龙梅)

通信作者: 徐海峰, Email: chxf@126.com

CoCl₂. The hypoxic cell models were established in DMEM with 100 μmol/L CoCl₂ and divided into the hypoxic 3-hour group, hypoxic 6-hour group, hypoxic 12-hour group and hypoxic 24-hour group, with the normal cultured cells as the normal control group. Apoptotic cells were determined by using hoechst 33342 stain. The expression levels of ANXA2 mRNA and protein in the cells were detected by real-time quantification PCR and Western blot, respectively. The expression and location of ANXA2 in the cells were examined by using immunofluorescence technique. **Results** The cultured cells grew well and showed the fusiform and polygonal shape, with positive expression of Thy-1 protein. Compared with the normal control group, the viabilities of the cells were insignificantly changed in the 50 μmol/L CoCl₂ group and 100 μmol/L CoCl₂ group (all at $P > 0.05$), but the cell viabilities were significantly reduced in the 200 μmol/L CoCl₂ group and 300 μmol/L CoCl₂ group in various time points (all at $P < 0.05$). Hoechst 33342 staining showed that the apoptotic cells with nuclear condensation and high green fluorescence intensity were obtained in the hypoxia groups. The relative expression levels of ANXA2 mRNA were significantly lower in the hypoxic groups than those in the normal control group (all at $P < 0.05$). The relative expression levels of ANXA2 protein were significantly lower in the hypoxia 3-, 6-, 12- and 24-hour group than those in the normal control group (all at $P < 0.05$). Apoptotic cells were seen in the hypoxic 3-hour group, hypoxic 6-hour group, hypoxic 12-hour group and hypoxic 24-hour group compared with the normal control group, showing the bright blue fluorescence in cellular nucleus for hoechst 33342. The relative expressing levels of ANXA2 mRNA in the cells were 0.80 ± 0.14 , 0.67 ± 0.33 , 0.49 ± 0.17 and 0.39 ± 0.02 in the hypoxic 3-hour group, hypoxic 6-hour group, hypoxic 12-hour group and hypoxic 24-hour group, which were significantly declined in comparison with the normal control group, with a statistically difference among the groups ($F = 434.354$, $P = 0.000$). The relative expression values of ANXA2 protein were 0.5526 ± 0.0123 , 0.4259 ± 0.0334 , 0.3449 ± 0.0178 and 0.3827 ± 0.0221 in the hypoxic 3-hour group, hypoxic 6-hour group, hypoxic 12-hour group and hypoxic 24-hour group, which were remarkably lower than 0.6021 ± 0.0014 in the normal control group, showing considerably difference among the groups ($F = 3.057$, $P = 0.000$). ANXA2 proteins were highly expressed in the cellular nucleus and less expressed in the cell membrane and cytoplasm in the normal cells. Compared with the normal control group, the ANXA2 protein showed weak expression in the hypoxia group and primarily in the cytoplasm. **Conclusions** The expression of ANXA2 down-regulates in hypoxic mouse RGC-5 cells, which may participate in the apoptosis process of RGCs in high glucose environment.

[Key words] Annexin A2; Retinal ganglion cells; Hypoxia; Apoptosis

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病中的微血管并发症之一,已经成为当前全球致盲的重要原因。DR的基本病理改变是血-视网膜屏障的破坏和视网膜新生血管的形成,引起黄斑水肿,甚至视网膜脱离。至今DR的发病机制尚未完全阐明,多年来对DR发病机制的研究主要集中在视网膜毛细血管微循环的改变上^[1-3],而对视网膜神经组织的研究较少^[4]。已有研究表明,在DR形成过程中神经细胞的损伤早于微血管病变^[5]。目前普遍认为DR的始动因素为高血糖及组织缺血缺氧^[6]。有研究推测,糖尿病患者因耗尽了神经元所依赖的神经营养因子而导致DR的发生^[7]。Hammos等^[8]证实神经生长因子可抑制早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglial cells, RGCs)和Müller细胞的凋亡。因此,预防RGCs的损伤、维持RGCs的功能可能是DR研究中的重要切入点。膜联蛋白A2(annexin A2, ANXA2)是钙依赖性膜磷脂结合蛋白家族中的一员。我们在前期研究中发现ANXA2在氧诱导的C57小鼠视网膜中表达增高,有促进血管生长的作用,参与人脐静脉内皮细胞骨架的重塑及细胞迁移能力的改变^[9]。既往研究证实,

ANXA2与神经组织的功能密切相关^[10]。然而,目前国内关于低氧对RGCs ANXA2表达变化影响的文献报道较少见。本研究中采用RGC-5细胞系在低氧条件下培养,观察细胞中ANXA2表达的情况,探讨低氧条件下RGCs的损伤机制,为预防和治疗DR寻找新的方向。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

小鼠RGC-5细胞系(美国标准菌库);DMEM/F12培养液、胰蛋白酶(美国Gibco公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(美国HyClone公司);大鼠抗小鼠Thy1单克隆抗体CD90(英国Abcam公司);山羊抗大鼠、山羊抗兔IgG抗体(中国中杉金桥生物技术有限公司);兔抗小鼠annexin II多克隆抗体(美国Santa Cruz公司);细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)(上海碧云天生物技术有限公司);GAPDH抗体(上海康成生物工程有限公司);Trizol试剂(美国Invitrogen公司);CoCl₂(美国Sigma公司)。激光扫描共焦显微镜

(日本 Nikon 公司); 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 酶联免疫检测仪、多功能酶标仪(美国 Spectramax M2 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及鉴定 取 RGC-5 于含质量浓度 25 mmol/L 葡萄糖、体积分数 10% FBS、 1×10^5 U/L 青霉素(商品单位)、质量浓度 0.1 g/L 链霉素的常规高糖型 DMEM 培养液中, 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内培养及传代, 取第 5 ~ 10 代细胞用于实验。将培养液中 FBS 体积分数降至 2%, RGC-5 以 4×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 待细胞达到 70% 融合时, 取出培养板, 采用免疫荧光染色法对细胞进行鉴定。培养板置于质量分数 4% 多聚甲醛 37 °C 固定 15 min, BSA 37 °C 封闭 1 h, 滴加大鼠抗小鼠 Thy1 单克隆抗体 CD90(1:300)一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗。滴加山羊抗大鼠 IgG 抗体二抗 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗。PI 染细胞核, PBS 漂洗, 封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 在激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。

1.2.2 CCK-8 法检测 RGC-5 细胞活力 RGC-5 以 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 于含体积分数 10% FBS、25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液中培养。待细胞达到 50% 融合时, 分别更换含 CoCl₂ 终质量浓度为 0、50、100、200、300 μmol/L 的培养液, 分别于培养后 12、24、48 h 加入 CCK-8 溶液, 每孔 10 μl, 继续培养 2 h, 用多功能酶标仪测定波长为 450 nm 处的吸光度(A)值, 代表细胞活力。每组设 6 个复孔, 实验重复 3 次。以不含 CoCl₂ 培养液培养的 RGC-5 细胞作为正常对照组。

1.2.3 细胞分组 将 RGC-5 以 5×10^4 /ml 的密度接种于 25 cm 培养瓶中。当细胞达到 80% 融合时弃上清, 低氧组细胞更换为含 100 μmol/L CoCl₂ 和 2% FBS 的 DMEM 培养液进行培养, 分为低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组和低氧 24 h 组, 正常对照组细胞更换为含 2% FBS 的 DMEM 培养液。

1.2.4 Hoechst 33342 染色法观察 RGC-5 凋亡细胞核的形态 于低氧培养后 3、6、12、24 h 收集细胞, 各组细胞均加入 10 μg/ml hoechst 33342 工作液, 37 °C 条件下避光孵育 20 min, PBS 漂洗 2 遍, 超净工作台中避光条件下风干, 荧光显微镜下设置激发光为 360 nm, 发射光为 420 nm, 观察并拍照。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 ANXA2 mRNA 相对表达水平 低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组和低氧 24 h 组分别于培养后相应时间点收集细胞, 正常培养的细胞作为正常对照组。用 Trizol 试剂提取总 RNA, 计算总 RNA 浓度, 取总 RNA 2 μg 逆转录合成

cDNA, -20 °C 保存。cDNA 2 μl 作为模板, 加入相应引物进行 PCR 扩增, 总反应体积 50 μl。检索 Genbank 数据库获得 ANXA2 的核酸序列, 经引物设计软件 Primer 5.0 分析设计引物, PCR 引物序列见表 1。扩增反应条件: 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 延伸 1 min, 共循环 50 次。根据 PCR 产物的溶解曲线和扩增曲线来分析结果的可靠性。以 GAPDH 为内参, 细胞中 ANXA2 mRNA 相对表达水平以 2^{-ΔΔCt} 进行计算。实验重复 3 次, 取其平均值。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
GAPDH	F: ATCATCCCTGCCTCTACTGG
	R: GTCAGGTCCACCACTGACAC
	P: ACCTTGCCACAGCCTTGGC
ANXA2	F: CAAGACCAAAGGTGTGGATG
	R: CAGTGTCTGATGCAAGTTCCT
	P: TGACCAACCGCAGCAATGCA

注: F: 上游序列; R: 下游序列; P: 探针序列; ANXA2: 膜联蛋白 A2

1.2.6 Western blot 法检测各组细胞中 ANXA2 蛋白的相对表达 低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组和低氧 24 h 组分别于培养后相应时间点收集细胞, 加入组织蛋白提取液, 匀浆 10 min, 冰上孵育 30 min。4 °C 条件下 10 000×g 离心 5 min, 收集上清, 考马斯亮蓝染色法测定总蛋白质量浓度, 按照每泳道 40 μg 总蛋白上样, 质量分数 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 4 °C 下 110 V 恒压转印至 PVDF 膜上, 质量分数 5% BSA(用含体积分数 0.1% Tween 20 的 TBST 液稀释)室温下封闭 1 h。滴加 annexin II 多克隆抗体(1:800), 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗。辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体(1:3 000)室温下孵育 1 h, TBST 漂洗。Western blot 荧光剂显影。以 GAPDH 为内参, 通过目的基因与内参条带的 A 值比值进行目的蛋白的相对含量分析。正常培养的细胞作为正常对照组。实验重复 3 次, 取其平均值。

1.2.7 免疫荧光法检测各组细胞中 ANXA2 的表达分布 以 2×10^3 /孔的密度将 RGC-5 接种于 96 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞达 70% 融合时弃上清, 缺氧组和正常对照组细胞先用含 100 μmol/L 终质量浓度 CoCl₂+2% FBS 的 DMEM 培养液和 2% FBS 的 DMEM 培养液分别培养 3、12、24 h, 先后滴加 annexin II 多克隆抗体(1:200)和相应 IgG 荧光二抗(1:50), 用免疫荧光法检测 ANXA2 在 RGC-5 中的分布, 激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验证实组间方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计,多个组间细胞活力(A 值)、RGC-5 细胞中 ANXA2 mRNA 和蛋白表达的总差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RGC-5 的形态和鉴定

体外培养的 RGC-5 呈多边形或梭形,细胞贴壁生长。RGCs 特异性表面抗原 Thy-1 免疫荧光显示,体外培养的 RGC-5 中 Thy-1 表现为绿色荧光,细胞核呈红色荧光(图 1)。

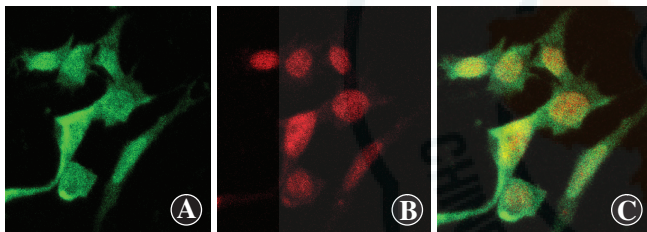


图 1 体外培养 RGC-5 细胞的 Thy-1 免疫荧光鉴定 (FITC ×400)
A: Thy-1 表现为绿色荧光 B: 细胞核呈红色荧光 C: A 图与 B 图的融合图

2.2 不同浓度 CoCl₂ 作用后 RGC-5 的增殖活力

50 μmol/L CoCl₂ 组、100 μmol/L CoCl₂ 组各时间点细胞活力值与正常对照组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与正常对照组比较,200 μmol/L CoCl₂ 组、300 μmol/L CoCl₂ 组细胞培养后 12 h、24 h、48 h,细胞活力值均显著降低,差异均有统计学意义(200 μmol/L CoCl₂ 组: $t = 2.294, 3.035, 8.168$, 均 $P < 0.05$;300 μmol/L CoCl₂ 组: $t = 2.115, 4.325, 5.239$, 均 $P < 0.01$)(表 2)。

表 2 不同浓度 CoCl₂ 组各时间点 RGC-5 细胞的活力值 ($\bar{x} \pm s, A_{450}$)

组别	样本量	细胞活力值		
		12 h	24 h	48 h
正常对照组	5	1.007 ± 0.004	1.007 ± 0.006	1.010 ± 0.008
50 μmol/L CoCl ₂ 组	5	0.987 ± 0.014	0.985 ± 0.014	0.979 ± 0.020
100 μmol/L CoCl ₂ 组	5	0.977 ± 0.021	0.976 ± 0.022	0.971 ± 0.027
200 μmol/L CoCl ₂ 组	5	0.962 ± 0.018*	0.945 ± 0.021*	0.872 ± 0.042*
300 μmol/L CoCl ₂ 组	5	0.902 ± 0.011*	0.889 ± 0.030*	0.659 ± 0.030*

注: $F_{\text{分组}} = 20.447, P = 0.001$; $F_{\text{时间}} = 8.535, P = 0.000$ 。与各自时间点正常对照组比较,* $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett *t* 检验)

2.3 低氧不同时间组 RGC-5 的细胞核形态变化

正常对照组细胞的细胞核内 DNA 分布均匀,细胞核无固缩,体积较大,hoechst 33342 染色呈现均匀蓝色荧光(图 2A);低氧组细胞的细胞核内 DNA 浓聚,染色质固缩,凋亡的细胞核呈碎块状致密浓染,染色质边集,细胞核内可见致密的亮蓝色强荧光(图 2B ~ D);随着 100 μmol/L CoCl₂ 作用时间的延长,凋亡细胞核的数量增加。

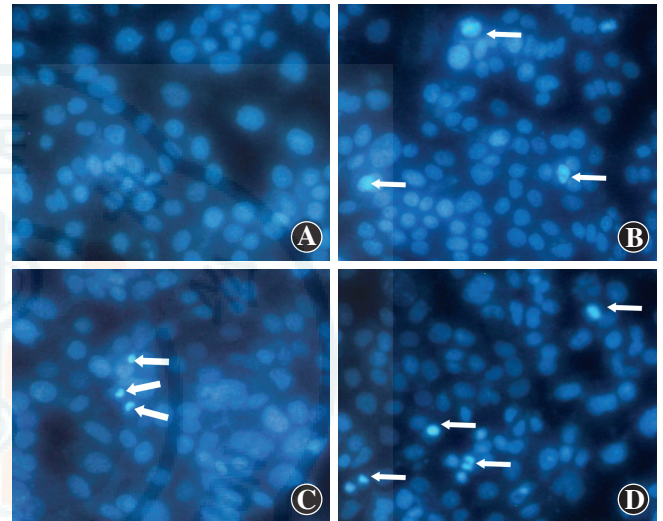


图 2 低氧组和正常对照组细胞核的形态学对比 (Hoechst ×400)
A: 正常对照组细胞核无固缩,hoechst 33342 染色未见致密的亮蓝色强荧光 B: 100 μmol/L CoCl₂ 作用 3 h 后,细胞核内可见致密的亮蓝色强荧光(箭头) C: 100 μmol/L CoCl₂ 作用 12 h 后,可见浓缩和致密亮蓝色强荧光的凋亡细胞核(箭头) D: 100 μmol/L CoCl₂ 作用 24 h 后,凋亡的细胞核数目增多(箭头)

2.4 低氧处理后不同时间组 RGC-5 细胞中 ANXA2 mRNA 的相对表达变化

正常对照组、低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组和低氧 24 h 组细胞中 ANXA2 mRNA 的相对表达量分别为 $0.80 \pm 0.14, 0.67 \pm 0.33, 0.49 \pm 0.17$ 和 0.39 ± 0.02 ,表现为随时间延长呈进行性下降趋势,总体比较差异有统计学意义($F = 434.354, P = 0.000$),其中低氧 3 h、6 h、12 h、24 h 组细胞中 ANXA2 mRNA 的相对表达量均明显低于正常对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 3)。

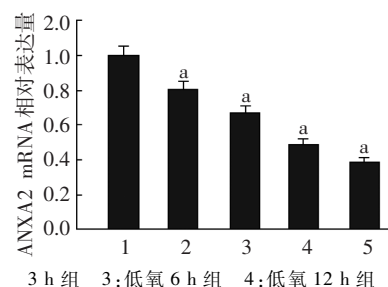


图 3 低氧处理后不同时间组细胞中 ANXA2 mRNA 相对表达量的比较 $F = 434.354, P = 0.000$ 。与正常对照组比较,* $P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验)
1: 正常对照组 2: 低氧 3 h 组 3: 低氧 6 h 组 4: 低氧 12 h 组 5: 低氧 24 h 组

2.5 低氧处理后不同时间组 RGC-5 细胞中 ANXA2 蛋白的相对表达变化

正常对照组、低氧 3 h 组、低氧 6 h 组、低氧 12 h 组和低氧 24 h 组细胞中 ANXA2 蛋白相对表达量的总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 3.057, P = 0.000$), 其中低氧 3 h、6 h、12 h、24 h 组细胞中 ANXA2 蛋白相对表达量均明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4, 表 3)。

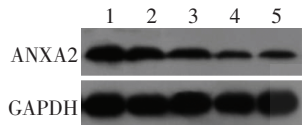


图 4 Western blot 法检测 ANXA2 蛋白在 RGC-5 细胞中的表达 随着低氧培养时间的延长, RGC-5 细胞中 ANXA2 蛋白表达逐渐减弱 1: 正常对照组 2: ANXA2: 膜联蛋白 A2

低氧 3 h 组 3; 低氧 6 h 组 4; 低氧 12 h 组 5; 低氧 24 h 组 ANXA2: 膜联蛋白 A2

表 3 正常对照组与低氧不同时间组 ANXA2 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, A$ 值)

组别	样本量	ANXA2 相对表达量
正常对照组	3	0.6021 ± 0.0014
低氧 3 h 组	3	0.5526 ± 0.0123
低氧 6 h 组	3	0.4259 ± 0.0334 ^a
低氧 12 h 组	3	0.3449 ± 0.0178
低氧 24 h 组	3	0.3827 ± 0.0221
<i>F</i>		3.057
<i>P</i>		0.000

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验) ANXA2: 膜联蛋白 A2

2.6 低氧处理不同时间组 RGC-5 中 ANXA2 蛋白的表达分布

正常对照组 ANXA2 蛋白主要表达在 RGC-5 的细胞核中, 少量表达于细胞质及细胞膜中, 呈绿色荧光, 低氧不同时间组的细胞内均可见 ANXA2 蛋白表达。与正常对照组相比, 低氧不同时间组 RGC-5 的细胞质中呈现出低密度的绿色荧光 (图 5), 但细胞核中的 ANXA2 蛋白明显增强。

3 讨论

ANXA2 又称 p36 和 annexin II, 是 annexins 超家族中 A 亚家族的重要成员。Annexins 蛋白家族是一组钙离子介导的磷脂结合蛋白, 其中 ANXA2 在生物膜结构域的建立和稳定^[11] 及细胞生物功能的维护如跨膜运输^[12]、离子通道的结构和功能^[13]、DNA 合成^[14] 及细胞增生^[15] 等方面发挥重要作用, 细胞外的 ANXA2 还作为受体, 参与纤维蛋白溶解^[16]、细胞间黏附、配体介导的细胞信号转导^[17] 和病毒感染^[18] 等。到目前为止尚不能确定 Annexin 基因突变可引起哪些

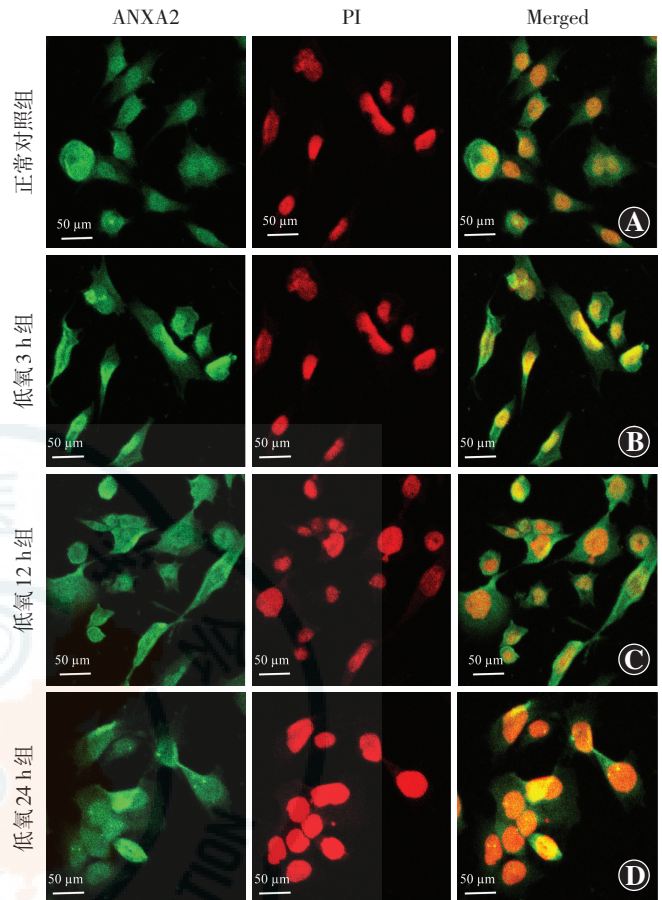


图 5 免疫荧光法检测 ANXA2 蛋白在低氧处理后不同时间组 RGC-5 中的表达 ($\times 400$) ANXA2 在 RGC-5 中表现为绿色荧光, 细胞核为红色荧光 A: 正常对照组 RGC-5 细胞核及细胞质中绿色荧光较均匀 B: 低氧 3 h 组可见细胞核中绿色荧光明显增强, 细胞质中绿色荧光减弱 C: 低氧 12 h 组细胞核中绿色荧光强于正常对照组, 细胞质中绿色荧光弱于正常对照组 D: 低氧 24 h 组细胞核中可见较强的绿色荧光, 细胞质中绿色荧光较弱 ANXA2: 膜联蛋白 A2

病变, 然而, 有证据表明, annexins 的表达、特性或定位的改变可引起病理生理的改变。研究发现, 纤溶酶原激活系统受到抑制会导致神经系统的炎症^[19], 并且纤维蛋白的累积与病变程度密切相关^[20], 如在坐骨神经挤压伤的动物模型中发现, 组织纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA) 的缺失导致纤维蛋白的沉积, 并加剧神经元轴突损伤^[21]。ANXA2 作为 tPA 及纤溶酶原的共受体, 使 tPA 的催化效率提高约 60 倍, 极大地促进了纤溶蛋白酶的生成, 有利于纤维蛋白的溶解^[22], 进而促进角膜及视网膜新生血管的形成^[23-24]。在中枢神经系统中, ANXA2 参与 tPA 介导的神经胶质细胞活化^[25], 并参与星形胶质细胞中胶质纤维酸性蛋白纤维的组装^[26]。星形胶质细胞能释放多种胶质细胞源性递质, 调节突触信号的传递, 对神经元具有营养和保护作用; 此外其释放的雌激素、凝血酶蛋白、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 能诱导

