

CCN1 siRNA 对视网膜血管内皮细胞活性的抑制及其机制

底煜 张轶欧 王爱媛 陈晓隆

110004 沈阳,中国医科大学附属盛京医院眼科(底煜、王爱媛、陈晓隆);110122 沈阳,中国医科大学人事处(张轶欧)

通信作者:陈晓隆,Email:chenxiaolongsy@yeah.net

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.005

【摘要】 背景 富含半胱氨酸蛋白 61 (Cyr61)/CCN1 在早产儿视网膜病变 (ROP) 的视网膜新生血管 (RNV) 形成中发挥重要作用,但目前国内外关于 CCN1 小干扰 RNA (CCN1 siRNA) 对 ROP 有无延缓和治疗作用的研究较少。目的 探讨特异性抑制 CCN1 的表达对视网膜血管内皮细胞的调控作用。方法 恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞株 (RF/6A) 分别于常氧 (正常对照组) 和低氧环境 (体积分数 1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂ 的混合气体) 中培养,低氧环境培养的细胞分别采用脂质体 Lipofectamine™2000 介导转染空载体质粒 (低氧对照组) 和 CCN1 siRNA 表达质粒 (CCN1 siRNA 转染组),于细胞转染后 24 h 采用逆转录 PCR 法检测细胞中 CCN1 siRNA 重组质粒的表达情况;分别于培养后 0、24、48、72 和 96 h 采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法测定各组细胞活性并绘制细胞生长曲线;于培养后 24 h 采用流式细胞术检测各组培养细胞的增生和凋亡情况;于培养后 24 h 采用免疫荧光技术和 Western blot 法检测各组 RF/6A 细胞中 CCN1 和血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白的表达。结果 细胞转染后 24 h 用逆转录法检测到细胞中 CCN1 siRNA 的表达条带。CCK-8 检测显示随着培养时间的延长,RF/6A 细胞增值值 (吸光度, A 值) 均明显增加,但 CCN1 siRNA 转染组各时间点细胞增值值均明显低于正常对照组和低氧对照组,总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 198.45, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 39.26, P < 0.05$); CCN1 siRNA 转染组、正常对照组和低氧对照组细胞的凋亡率分别为 (68.9 ± 1.1)%、(18.9 ± 1.3)% 和 (39.6 ± 1.8)%, 其中 CCN1 siRNA 转染组细胞的凋亡率明显高于正常对照组和低氧对照组,差异均有统计学意义 ($t = 2.93, 2.56, \text{均 } P < 0.05$); CCN1 和 VEGF 蛋白在正常对照组细胞中呈弱表达,在低氧对照组细胞中表达均明显增强,CCN1 siRNA 转染组细胞中 CCN1 和 VEGF 的相对表达量较低氧对照组均明显下降 (均 $P < 0.05$)。结论 CCN1 siRNA 转染后能抑制 RF/6A 细胞的增生并促进其凋亡,CCN1 siRNA 可下调缺氧环境下 RF/6A 细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白的表达水平,可能是抑制 RNV 形成的主要机制。

【关键词】 富含半胱氨酸蛋白 61/生理; 视网膜新生血管/预防及控制; 早产儿视网膜病变/治疗; 缺氧; RNA 干扰; 血管内皮生长因子; 恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81371045); 辽宁省科技计划基金项目 (2010225034); 辽宁省博士启动基金项目 (201501020)

Inhibition of CCN1 siRNA on retinal endothelial cells Di Yu, Zhang Yiou, Wang Aiyuan, Chen Xiaolong

Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Di Y, Wang AY, Chen XL); Department of Personal, China Medical University, Shenyang 110122, China (Zhang YO)

Corresponding author: Chen Xiaolong. Email: chenxiaolongsy@yeah.net

【Abstract】 **Background** Cysteine-rich 61 (Cyr61)/CCN1 has been reported to stimulate retinal neovascularization (RNV) in retinopathy of prematurity (ROP). However, whether CCN1 small interfering RNA (CCN1 siRNA) can inhibit or cure ROP has not been extensively investigated. **Objective** This study was to investigate the regulation effect of CCN1 specific siRNA expression vector on retinal endothelial cells. **Methods** Rhesus choroid-retinal vascular endothelial cells (RF/6A) were cultured under the normoxic (normoxia control group) and hypoxic condition (1% O₂, 5% CO₂ with 94% N₂) *in vitro*, and then lipofectamine™2000 (LF2000) vector plasmid with or without CCN1 siRNA was transiently transfected in the hypoxic-cultured cells as the CCN1 siRNA transfected group and hypoxic control group, respectively. Reverse transcription PCR was employed to detect

the expression of CCN1 siRNA plasmid 24 hours after transfection. The vitality of the cells was assayed by cell counting kit-8 (CCK-8) 0, 24, 48, 72 and 96 hours after cultured. Twenty-four hours after cultured, the apoptosis of the cells was evaluated by flow cytometry, and the expressions of CCN1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) proteins were detected by immunofluorescence technique and Western blot assay. **Results** The expression band of CCN1 siRNA was detected in the cells 24 hours after transfection of CCN1 siRNA. CCK-8 assay showed that RF/6A cells were significantly increased over time, and the proliferating value (absorbancy) of the cells was significantly reduced in the CCN1 siRNA transfected group compared with in the normoxia control group and hypoxic control group ($F_{\text{group}} = 198.45, P < 0.05; F_{\text{time}} = 39.26, P < 0.05$). The apoptosis rates of the cells were $(68.9 \pm 1.1)\%$, $(18.9 \pm 1.3)\%$ and $(39.6 \pm 1.8)\%$ in the CCN1 siRNA transfected group, normoxia control group and hypoxic control group, and the apoptosis rates of the CCN1 siRNA transfected group were evidently higher than those of the normoxia control group and hypoxic control group ($t = 2.93, t = 2.56$, both at $P < 0.05$). CCN1 and VEGF proteins were weakly expressed in the normoxia control group and strongly expressed in the hypoxic control group, however, their expression intensity was evidently weakened in the CCN1 siRNA transfected group. The related expression levels of CCN1 and VEGF proteins in the CCN1 siRNA transfected group were significantly lower than those in the hypoxic control group (both at $P < 0.05$). **Conclusions** RNA interference targeting CCN1 can inhibit proliferation and promote apoptosis of RF/6A cells. CCN1 siRNA can arrest RNV probably by downregulating the expression levels of CCN1 and VEGF in the cells.

[Key words] Cysteine-rich proein 61/physiology; Retinal neovascularization/prevention & control; Retinopathy of prematurity/therapy; Anoxia; RNA, small interfering; Vascular endothelial growth factor; Choroid-retinal vascular endothelial cells, Rhesus

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81371045); Science and Technology Project of Liaoning Province (2010225034); Startup Foundation for Docotors of Liaoning Province (201501020)

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是视网膜血管异常增生引起的婴幼儿致盲眼病, 其主要的病理基础在于视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 的形成^[1-2]。RNV 血管通透性增加, 伴随着血管内皮细胞的激活、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解, 血管内皮细胞增生和迁移并分泌血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF), 最终形成新的管腔结构^[3]。新生血管芽在新形成的细胞外基质和周细胞的支持作用下生长, 并受多种血管生成因子的调控而逐渐形成血管网^[4]。因此, 视网膜血管内皮细胞 (retinal endothelial cells, RECs) 的生物学行为在 RNV 的形成过程中占主导地位。半胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich 61, Cyr61)/CCN1 是一种重要的基质细胞蛋白, 参与调节细胞的增生、黏附、迁移、分化、凋亡以及 ECM 的生成, 在胚胎发育、软骨生成、血管生成、肿瘤的发生和发展以及伤口修复中发挥作用^[5-12]。同时, CCN1 还可以通过调节血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、I 型胶原、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 及其抑制剂等的表达和活性间接地促进血管生成和基质重建^[13-14], 但其相互作用的具体途径仍在研究中。本研究中观察抑制 CCN1 表达对低氧培养的 RF/6A 细胞株增生和凋亡的影响, 为临床治疗 ROP 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 恒河猴脉络膜-RECs 细胞株 (RF/6A), 购自中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI-1640 培养液 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (美国 Beyotime 公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 KeyGEN 公司); Lipofectamine™ 2000 (美国 Invitrogen 公司); CCN1₁₀₇₂ 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 质粒 (上海 GenePharma 公司合成: 正义链 5'-GC AAGAAAUGCAGCAAGACCATT-3', 反义链 5'-UGGUC UUGCUGCAUUUCUUGCTT-3'); 兔抗人 CCN1 多克隆抗体 (ab24448) (英国 Abcam 公司); 兔抗人 VEGF 多克隆抗体 (sc-152)、FITC 标记兔抗山羊 IgG (sc-2777) (美国 Santa Cruze 公司)。CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司); 激光扫描共焦显微镜 (日本 Olympus 公司); 细胞培养板、细胞培养瓶 (美国 Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 RF/6A 细胞培养于含体积分数 10% 胎牛血清和 100 U/ml (商品单位) 青霉素双抗的 RPMI-1640 培养瓶中, 常规在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 和 20% O₂ 环境中培养至 70% ~ 80% 融合, 用

质量分数 0.25% 胰酶消化并传代。细胞进入对数生长期后更换为新鲜培养液,将细胞分别置于常氧(正常对照组)和低氧环境(体积分数 1% O₂、5% CO₂ 与 94% N₂ 混合气体)中培养。低氧环境细胞又分为低氧对照组和 CCN1 siRNA 转染组,分别以脂质体 Lipofectamine™2000 介导转染空载体质粒和 500 μg/μl CCN1 siRNA 重组质粒。细胞转染后继续在低氧环境下培养 24 h。

1.2.2 逆转录 PCR 法检测细胞中 CCN1 siRNA 重组质粒的表达 细胞转染后 24 h 提取 CCN1 siRNA 转染组细胞总 RNA。根据引物设计的原则设计针对 CCN1 的特异性引物。CCN1 的上游序列为 5'-CGAGGTGGA GTTGACGAGAA-3',下游序列为 5'-GCACTCAGGTT GTCATTGGT-3',扩增产物为 211 bp。反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 31 s,72 °C 延伸 2 min,共 50 个循环,72 °C 延伸 10 min。质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外线下观察电泳结果。

1.2.3 CCK-8 法测定细胞的增生 将 3 个组细胞接种于 96 孔板,分别添加 100 μl 的细胞悬液,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中温育 24 h,使细胞贴壁生长。分别在接种后 0、24、48、72 和 96 h 各取一块培养板,采用 CCK-8 检测细胞活性,参照 CCK-8 试剂盒说明书操作;用酶标仪在波长 450 nm 处检测每孔的细胞活性,以吸光度(A)值表示,绘制细胞随时间的生长曲线。

1.2.4 流式细胞术检测细胞的凋亡率 各组细胞于培养后 24 h 采用流式细胞术检测细胞的凋亡率,按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒说明书进行操作。离心半径为 14.75 cm,2 000 r/min,离心 5 min,收集悬浮细胞,PBS 洗涤,在 0.5 ml 缓冲液中加入 5 μl Annexin V-FITC 及 5 μl 的 PI,混匀,室温下避光孵育 15 min,置于流式细胞仪进行分析,每份样品检测 1×10⁴ 个细胞,应用 cell QUEST 软件分析结果。

1.2.5 免疫荧光法检测细胞中 CCN1、VEGF 蛋白的表达 培养后 24 h 取出细胞爬片,用质量分数 4% 多聚甲醛固定,充分水化,以质量分数 0.1% Triton X-100 孵育 10 min,PBS 洗涤,以体积分数 1% 牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭 1 h,滴加兔抗人 Cyr 61 多克隆抗体(1:150)、兔抗人 VEGF 多克隆抗体(1:100),4 °C 孵育过夜;滴加 FITC 标记兔抗山羊 IgG(1:90),室温避光孵育 1 h,滴加 DAPI 染核 5 min。激光扫描共焦显微镜下观察并采集图像。选取形态完好,荧光信号强的图像。染色以阳性信号部位着色清晰、背景不着色为佳,高倍镜下任意选取 10 个视野,测量细胞阳性信号的积分吸光度(A)值,取其平均值。

1.2.6 Western blot 法检测细胞中 CCN1、VEGF 蛋白的表达 培养后 24 h 收集 3 个组细胞至 EP 管中,提取总蛋白,行电泳、转膜,滴加相应抗体进行免疫杂交,然后进行化学发光、显影和定影。采用 β-actin 作为内参照。结果用 Chemi Imager 5500 V2.03 图像分析系统进行扫描,用 Fluor Chen 2.0 软件进行整合吸光度分析。目的蛋白的相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/β-actin 条带灰度值,抑制率 = (低氧对照组蛋白相对表达量 - CCN1 siRNA 转染组蛋白相对表达量)/低氧对照组蛋白相对表达量 × 100%。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。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。组间方差经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组三水平实验设计,正常对照组、低氧对照组和 CCN1 siRNA 转染组在培养不同时间的细胞增生值总体差异比较采用两因素方差分析。3 个组间细胞凋亡率、CCN1 和 VEGF 蛋白在细胞中相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,多重比较均采用 LSD-t 检验。采用双侧检验,检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 CCN1 siRNA 转染组细胞中 CCN1 siRNA 重组质粒的表达

质粒转染后 24 h,CCN1 siRNA 转染组细胞中可见 CCN1 siRNA 重组质粒的扩增条带(图 1)。

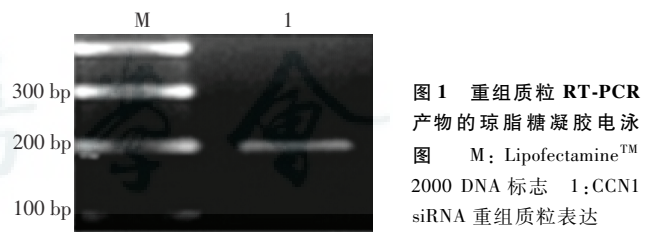


图 1 重组质粒 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图 M: Lipofectamine™2000 DNA 标志 1:CCN1 siRNA 重组质粒表达

2.2 各组细胞的增生值比较

随着体外培养时间的延长,各组 RF/6A 细胞数目迅速增加,其中 CCN1 siRNA 转染组的细胞生长速度较正常对照组和低氧对照组明显减慢,增生能力减弱。各组在不同时间点细胞增生值(A 值)的总体比较差异均有统计学意义($F_{组别} = 198.45, P < 0.05; F_{时间} = 39.26, P < 0.05$);各组内随着培养时间延长,细胞的增生值均明显高于相邻的前一时间点增生值,同一时间点低氧对照组和 CCN1 siRNA 转染组细胞增生值均明显低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2,表 1)。

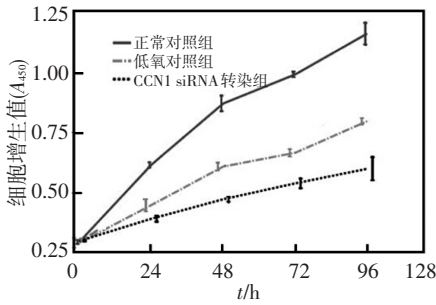


图 2 各组细胞的生长曲线 各组 RF/6A 细胞数目迅速增加,CCN1 siRNA 转染组的细胞增殖能力减弱 siRNA:小干扰 RNA

表 1 3 个组不同培养时间点细胞增殖值的比较 ($\bar{x} \pm s, A_{450}$)

组别	样本量	不同培养时间点细胞增殖值				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
正常对照组	16	0.296±0.001	0.618±0.001 ^a	0.886±0.003 ^b	0.988±0.001 ^c	1.161±0.004 ^d
低氧对照组	16	0.296±0.001	0.432±0.002 ^{ac}	0.603±0.003 ^{bc}	0.663±0.003 ^{ce}	0.789±0.004 ^{de}
CCN1 siRNA 转染组	16	0.297±0.002	0.321±0.001 ^{ac}	0.465±0.002 ^{bc}	0.539±0.002 ^{ce}	0.625±0.003 ^{de}

注: $F_{\text{组别}} = 198.45, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 39.26, P < 0.05$. 与各自组内 0 h 比较, ^a $P < 0.05$; 与各自组内 24 h 比较, ^b $P < 0.05$; 与各自组内 48 h 比较, ^c $P < 0.05$; 与各自组内 72 h 比较, ^d $P < 0.05$; 于同时点正常对照组比较, ^e $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD- t 检验) siRNA:小干扰 RNA

2.3 各组细胞的凋亡率比较

CCN1 siRNA 转染组、正常对照组和低氧对照组细胞的凋亡率分别为 (69.3±1.1)%、(19.0±1.3)% 和 (40.4±1.8)%, 3 个组间细胞凋亡率的总体比较差异有统计学意义 ($F = 268.35, P = 0.023$), 其中 CCN1 siRNA 转染组细胞的凋亡率明显高于正常对照组和低氧对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 2.93, 2.56$, 均 $P < 0.05$) (图 3)。

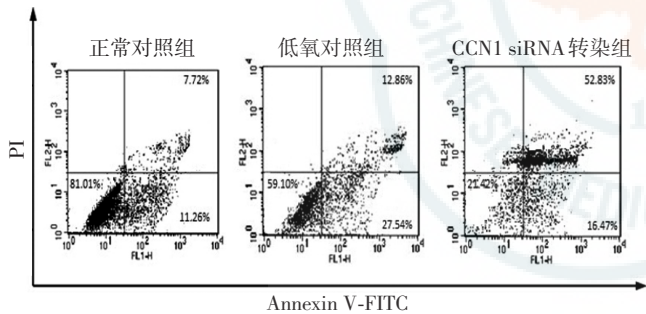


图 3 Annexin V/PI 双染法检测各组细胞的凋亡 siRNA:小干扰 RNA

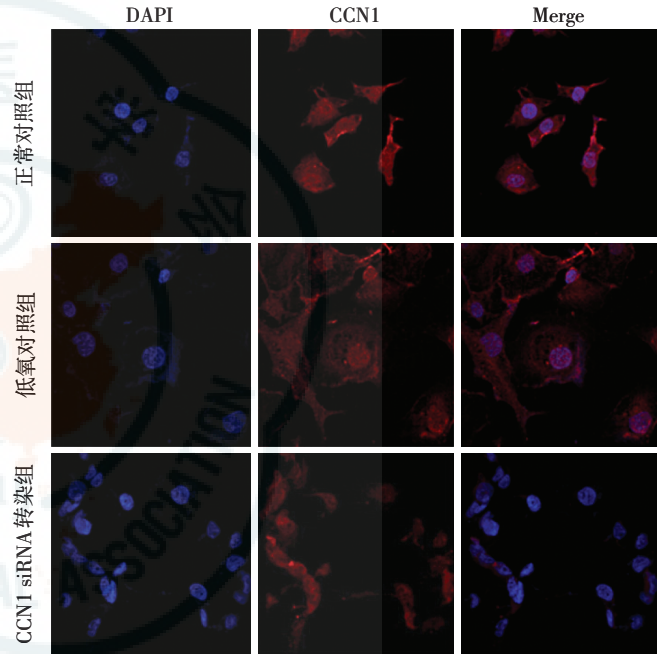


图 4 各组 RF/6A 细胞中 CCN1 蛋白的表达 (FITC × 600) CCN1 蛋白阳性表达呈红色荧光 siRNA:小干扰 RNA

2.4 各组细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白的表达变化

CCN1 蛋白主要表达于细胞质和细胞核中, 呈红色荧光, 细胞核染色为蓝色荧光。正常对照组细胞中 CCN1 蛋白呈微弱表达, 低氧对照组 CCN1 蛋白表达呈强阳性, 而 CCN1 siRNA 转染组细胞中 CCN1 蛋白表达减弱。CCN1 siRNA 转染组、正常对照组和低氧对照组细胞中 CCN1 蛋白的表达强度 (A 值) 分别为 80.24±4.13、163.35±5.32 和 69.56±5.81, 3 个组总体比较差异有统计学意义 ($F = 213.53, P = 0.015$), 其中低氧对照组细胞中 CCN1 蛋白表达强度明显强于正常对照组, CCN1 siRNA 转染组细胞中 CCN1 蛋白表达强度明显低于低氧对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 2.31, 3.25, P < 0.05$) (图 4, 5)。

VEGF 蛋白主要表达于细胞质和细胞核, 呈绿色荧光, 细胞核染色为蓝色荧光。正常对照组细胞中

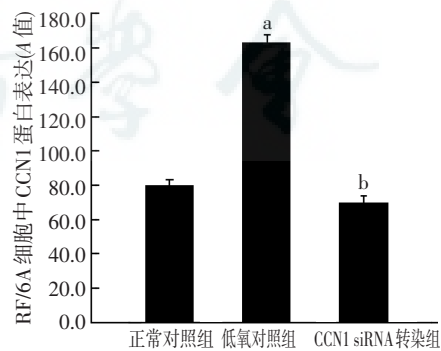


图 5 各组 RF/6A 细胞中 CCN1 蛋白的表达情况 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与低氧对照组比较, ^b $P < 0.05$ ($n = 10$) siRNA:小干扰 RNA

VEGF 蛋白呈弱表达, 低氧对照组细胞中呈强阳性表达, 而 CCN1 siRNA 转染组 VEGF 蛋白表达减弱。CCN1 siRNA 转染组、正常对照组和低氧对照组细胞中 VEGF 蛋白表达强度 (A 值) 分别为 102.59±5.91、179.45±5.94 和 89.48±5.35, 3 个组总体比较差异有统计学意义 ($F = 187.25, P = 0.010$), 其中低氧对照组

细胞中 VEGF 蛋白表达强度明显强于正常对照组, CCN1 siRNA 转染组细胞中 VEGF 蛋白表达强度明显低于低氧对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 3.16$ 、 $4.23, P < 0.05$) (图 6, 7)。

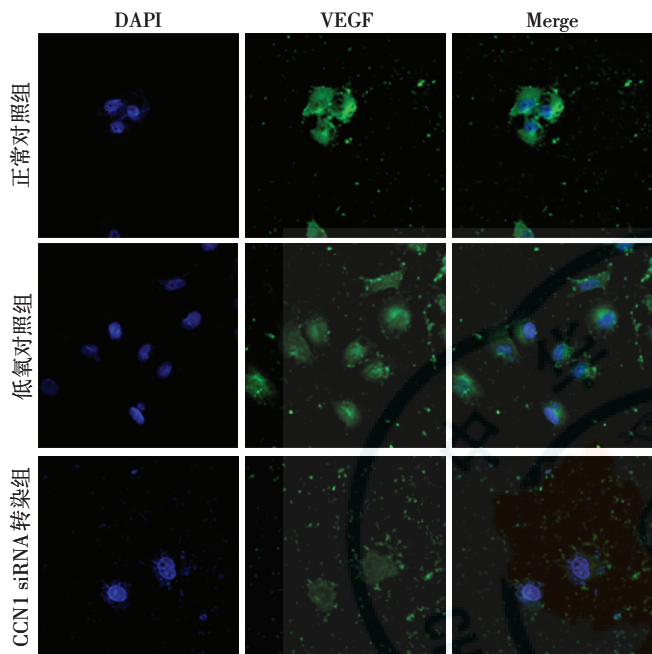


图 6 各组 RF/6A 细胞中 VEGF 蛋白的表达 (FITC × 600) VEGF 蛋白阳性表达呈绿色荧光 VEGF: 血管内皮生长因子; siRNA: 小干扰 RNA

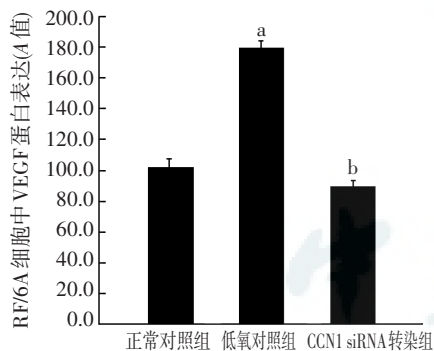


图 7 柱状图显示各组 RF/6A 细胞中 VEGF 蛋白的表达情况 与正常对照组比较, $^a P < 0.05$; 与低氧对照组比较, $^b P < 0.05$ ($n = 10$) siRNA: 小干扰 RNA; VEGF: 血管内皮生长因子

2.5 各组细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白的表达变化

正常对照组细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白表达条带强度较弱, 低氧对照组细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白表达条带较强, CCN1 siRNA 转染组较正常对照组和低氧对照组表达强度减弱。3 个组间 CCN1 和 VEGF 蛋白的相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 167.23, P = 0.037; F = 214.42, P = 0.025$), 其中低氧对照组细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白的相对表达量明显强于正常对照组, CCN1 siRNA 转染组细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白的相对表达量明显低于低氧对照组, 差异

均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。CCN1 siRNA 转染组 CCN1 和 VEGF 蛋白表达抑制率分别为 27.11%、26.64% (图 8, 表 2)。

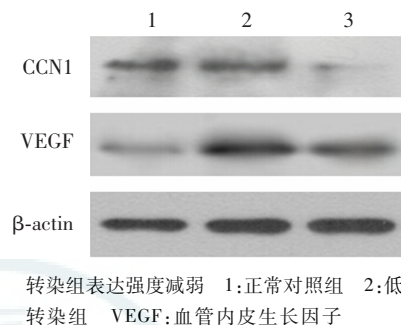


图 8 Western blot 检测 RF/6A 细胞中 CCN1 和 VEGF 蛋白的相对表达量 正常对照组 CCN1 和 VEGF 蛋白表达条带较弱, 低氧对照组 CCN1 和 VEGF 蛋白表达条带较强, CCN1 siRNA 转染组表达强度减弱 1: 正常对照组 2: 低氧对照组 3: CCN1 siRNA 转染组 VEGF: 血管内皮生长因子

表 2 各组细胞中 CCN1 蛋白和 VEGF 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CCN1 蛋白	VEGF 蛋白
正常对照组	16	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02
低氧对照组	16	0.90 ± 0.02 ^a	1.72 ± 0.01 ^a
CCN1 siRNA 转染组	16	0.12 ± 0.03	0.43 ± 0.01
<i>F</i>		167.230	214.420
<i>P</i>		0.037	0.025

注: 与各自的 CCN1 siRNA 转染组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; siRNA: 小干扰 RNA

3 讨论

CCN 家族编码的蛋白具有镶嵌型多模块结构, 能调节细胞间的黏附和移行, 促进细胞的有丝分裂及分化, 同时它们在新血管形成、肿瘤复发及转移、纤维变性等方面起着重要的调节作用^[15]。CCN 家族首个克隆基因 *CCN1* 在不同细胞中的表达受多种信号通路的调控, 可与多种整联蛋白结合, 可能通过参与 Wnt、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、酪氨酸激酶、Akt 等信号转导通路调控其他细胞因子的表达, 在 RNV 过程中扮演着关键的角色^[16]。但目前国内外对 CCN1 siRNA 是否能够抑制 RNV 形成的报道尚少。

本研究中采用缺氧环境培养的 RF/6A 细胞模拟 ROP 的体外模型, 研究 CCN1 siRNA 对 RF/6A 细胞生长情况和 CCN1、VEGF 蛋白表达的影响。本研究中选用的 Lipofectamine™2000 脂质体转染试剂容易透过细胞膜, 转染效率较高, 对基因片段大小的限制较小, 转染后对细胞的损伤小, 可在含或不含血清的培养基中直接进行转染, 转染后无需要更换或增加培养基^[17], 但是因其为阳离子脂质体, 对细胞的毒性较高。为了降低其毒性, 本研究中在脂质体与质粒的适宜比例及合适的细胞转染时间等方面摸索出适宜的实验条件。

本研究中采用 CCK-8 法检测重组质粒对细胞存

