

重组质粒 pRNAT-U6.1/CFB siRNA 的构建、鉴定及其对人脐静脉内皮细胞增生的影响

全欢 尚庆丽 马景学 高建 王鑫

【摘要】 背景 脉络膜新生血管(CNV)是多种眼部疾病致盲的原因之一,研究发现补体系统在 CNV 的发病机制中起重要作用。目的 构建针对补体因子 B(CFB)的小干扰 RNA (siRNA)重组质粒,体外观察其对人脐静脉内皮细胞 ECV-304 增生的影响。方法 根据人 CFB 的基因序列设计引物,经 PCR 扩增后与质粒 pRNAT-U6.1 连接,得到重组质粒 pRNAT-U6.1/CFB siRNA,并进行测序鉴定和 PCR 鉴定。ECV-304 细胞株进行常规培养,用电转染技术将重组质粒或空质粒分别转染人 ECV-304 细胞株,分为 CFB-siRNA 转染组和空质粒转染组,未转染的细胞为空白对照组。细胞转染后继续培养 48 h,于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达并计算转染效率;采用半定量逆转录 PCR(RT-PCR)法测定各组细胞中 CFB mRNA 的相对表达量;用 MTT 法检测各组细胞转染 24、48 和 72 h 时细胞的增值值(A)并计算生长抑制率;利用流式细胞技术检测各组细胞的生长周期变化。结果 PCR 扩增的目的片段序列与 CFB 基因序列完全相符,ECV-304 细胞转染后,倒置荧光显微镜下可见 CFB-siRNA 转染组和空质粒转染组的细胞中 GFP 呈绿色荧光。半定量 RT-PCR 结果显示,CFB-siRNA 转染组、空质粒转染组和空白对照组的 CFB mRNA 相对表达量分别为 0.07 ± 0.04 、 0.14 ± 0.02 和 0.14 ± 0.03 ,总体比较差异有统计学意义($F = 233.05, P = 0.00$);其中 CFB-siRNA 转染组 CFB mRNA 相对表达量明显低于空质粒转染组和空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。MTT 法检测结果显示,各组不同时间细胞增生抑制率总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 212.99, P = 0.00$);CFB-siRNA 转染组细胞转染 24、48、72 h 后细胞增生的抑制率分别为 $(23.45 \pm 0.01)\%$ 、 $(33.48 \pm 0.02)\%$ 和 $(45.49 \pm 0.01)\%$,明显高于同时间点空质粒转染组和空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。流式细胞仪检测结果显示,CFB-siRNA 转染组、空质粒转染组和空白对照组 G_1 期的细胞数占总细胞数的 $(44.4 \pm 0.5)\%$ 、 $(25.8 \pm 0.4)\%$ 和 $(27.9 \pm 0.6)\%$,总体比较差异有统计学意义($F = 58.98, P = 0.00$);CFB-siRNA 转染组 G_1 期和 G_2 期细胞所占百分比显著高于空白对照组和空质粒转染组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 重组质粒 pRNAT-U6.1/CFB siRNA 可通过将细胞阻滞在 G_1 期而有效抑制人脐静脉内皮细胞的增生。

【关键词】 脉络膜新生血管;小干扰 RNA;补体因子 B;脐静脉内皮细胞;人;ECV-30 细胞株

Construction and assessment of recombinant plasmid pRNAT-U6.1/CFB siRNA and its inhibitory effect on proliferation of human umbilical vein endothelial cells

Tong Huan, Shang Qingli, Ma Jingxue, Gao Jian, Wang Xin. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital of Hebei Medical College, Shijiazhuang 050000, China
Corresponding author: Shang Qingli, Email: qinglishang2013@sina.cn

【Abstract】 **Background** Choroidal neovascularization (CNV) is one of the causes of blindness in multiple eye diseases. Researches showed that complement system participates in the pathogenesis of CNV. **Objective** This study was to construct the recombinant of complement factor B-small interference RNA (CFB-siRNA) expression vector and to observe its inhibitory effect on human umbilical vein endothelial cells (ECV-304). **Methods** CFB gene primers were designed based on human CFB gene, and an expression vector of CFB-siRNA was constructed by inserting CFB-siRNA into pRNAT-U6.1/Neo plasmid. Recombinant plasmids were confirmed by the digestion analysis of restriction endonuclease, and all inserted sequences were verified by DNA sequencing. The recombinant pRNAT-

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.003

基金项目:河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(09966111D)

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院眼科(全欢、尚庆丽、马景学、王鑫);050000 石家庄,华北制药集团有限责任公司(高建)

通信作者:尚庆丽, Email: qinglishang2013@sina.cn

U6.1/CFB-siRNA plasmid and the blank plasmid were transfected into ECV-304 cells in the CFB-siRNA group and blank plasmid group by electroporation, respectively, and non-transfected cells served as the normal control group. The cells were observed under the fluorescence microscope 48 hours after transfection, and the transfection efficiency was calculated. The relative expression of CFB mRNA in the cells of different groups was detected by semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR). MTT was employed to calculate the growth inhibitory rates of the cells 24, 48 and 72 hours after transfection. The percentages of the cells in different cell cycles were detected by flow cytometry.

Results The sequence of the target vector was identical to the designed sequence. The green fluorescence protein (GFP) was seen in both the CFB-siRNA group and the blank plasmid group. The relative expression levels of CFB mRNA were 0.07 ± 0.04 , 0.14 ± 0.02 and 0.14 ± 0.03 in the CFB-siRNA group, the blank plasmid group and the normal control group, respectively, a significant difference was obtained among the three groups ($F = 233.05$, $P = 0.00$); the expression level of CFB mRNA in the CFB-siRNA group was significantly declined in comparison with the blank plasmid group and the normal control group (both at $P < 0.05$). The growth inhibitory rates of the cells were $(23.45 \pm 0.01)\%$, $(33.48 \pm 0.02)\%$ and $(45.49 \pm 0.01)\%$ at 24, 48 and 72 hours after transfection, respectively, a significant difference was obtained among the three groups ($F_{\text{group}} = 212.99$, $P = 0.00$); the growth inhibitory rates in CFB-siRNA group were significantly higher than that in the blank plasmid group and normal control group (all at $P < 0.05$). The percentages of G_1 phase cells were $(44.4 \pm 0.5)\%$, $(25.8 \pm 0.4)\%$ and $(27.9 \pm 0.6)\%$ in the CFB-siRNA group, the blank plasmid group and the normal control group respectively, a significant difference was obtained among the three groups ($F = 58.98$, $P = 0.00$). The percentages of G_1 phase and G_2 phase cells in the CFB-siRNA group were significantly higher than those in the blank plasmid group and the normal control group (all at $P < 0.05$).

Conclusions Recombinant pRNAT-U6.1/CFB siRNA inhibits the proliferation of ECV-304 cells effectively by arresting the cells in G_1 intermediate phase of the growth cycle.

[Key words] Choroidal neovascularization; Small interfering RNA; Complement factor B; Umbilical vein endothelial cell; Human; ECV-304

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是多种眼部疾病致盲的原因之一, 其发生机制尚未完全明确, 治疗效果也不尽如人意。近年来抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的药物, 如贝伐单抗、雷珠单抗、VEGF-Trap 及康柏西普等^[1-4] 已成为临床研究的热点, 但单纯的抗 VEGF 治疗仍不能达到根治 CNV 的目的, 也不能防止 CNV 的复发。研究发现, 补体活化的旁路途径在激光诱导 CNV 中发挥重要作用^[5-6], 而作为旁路途径的关键因子, 补体因子 B (complement factor B, CFB) 则提供了抑制 CNV 生成的新靶点^[7]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种外源性双链 RNA 抑制细胞内同源基因表达的现象, 其在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达, 与使目标基因永久性表达沉默的基因敲除方法不同, RNAi 通过降解具有同源序列靶基因的 mRNA 达到阻止靶基因表达的目的。RNAi 技术自 20 世纪 90 年代末发现以来, 已成功用于哺乳动物细胞的研究, 并成为研究基因功能的有效方法, 有望成为 CNV 特异性的基因治疗手段^[8-10]。本研究中构建 CFB 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 表达载体, 探讨 CFB 在实验性 CNV 的形成中所产生的分子生物学效应和机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

质粒 pRNAT-U6.1/Neo 带有人源的 U6 启动子和 CMV 启动子 (美国 GenScript 生物科技公司); 人脐静脉内皮细胞 ECV-304、大肠杆菌 DH5 α (石家庄华北制药集团新药研究开发中心); BamH I 和 Hind III 内切酶、T4DNA 连接酶、质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒 (Agarose Gel DNA Purification kit, ver 2.0) (大连 TaKaRa 公司); Mini RNAeasy 试剂盒、one-step 逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 试剂盒、高纯质粒提取试剂盒 (QIA filter Plasmid Midi)、QIAquick PCR 净化试剂盒 (德国 Qiagen 公司)。PE480 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 CFB-siRNA 真核表达载体的构建 从 GenBank 获取人 CFB 的 mRNA 序列 (NM_001710), 根据 siRNA 设计原则, 寻找 siRNA 靶序列, 使用 BLAST 将选定的序列与相应的人基因组数据库进行比较, 排除与其他编码序列和/或 EST 同源的序列, 遵循 PCR 引物设计的原则, 设计一对特异的 CFB 基因 PCR 引物, 上游引物: 5'-CGGGATCCCGTTCATCAATCATT

GGTAGAAAACATTGATATCCGTGTTTTCTACC-3'; 下游引物: 5'-CTTAAGCTTTTGGAAAAATTCATCAATCATTTGGTAGAAAACACGGATATC-3'。上下游引物序列分别加有 BamH I 和 Hind III 内切酶位点。以进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。再用 QIAquick PCR 试剂盒回收 PCR 扩增产物, 得到双链核苷酸片断。将质粒 pRNAT-U6.1 及双链核苷酸片断用 BamH I 和 Hind III 内切酶 37 °C 下孵育约 2 h, 然后对两者分别进行琼脂糖凝胶电泳, 切出含有目的 DNA 条带的琼脂糖凝胶, 用胶回收试剂盒回收质粒酶切片段, 将酶切后的双链核苷酸片断与质粒载体黏端用 DNA ligation 试剂盒进行连接反应, 于 16 °C 连接 2 h, 使双链核苷酸片段定向克隆入 pRNAT-U6.1 载体中, 命名为 CFB-siRNA; 采用氯化钙转化方法, 将重组质粒转化至感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 固体培养基培养, 挑取阳性载体克隆, 液体培养基培养 12 h, 用质粒小量提取试剂盒提取质粒, 应用 PCR 法进行鉴定。紫外分光光度法测定质粒 DNA 含量。

1.2.2 细胞培养与转染 以含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 为培养液, 常规方法培养人脐静脉内皮细胞 ECV304 至对数生长期, 收集细胞, 以 1×10^7 /ml 的密度重悬于 0 °C 电穿孔缓冲液中, 取 0.5 ml 移入电转杯中。将 40 μ l 待转染的 CFB-siRNA 质粒与空质粒分别加入各电转杯的细胞悬液中, 设定电压为 200 V, 电容为 900 μ F, 电击 70 ms, 分别为 CFB-siRNA 转染组和空质粒转染组, 未转染细胞为空白对照组, 再用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基继续培养各组细胞 48 h, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 的表达及其在细胞中的定位, 计算质粒的转染效率, 转染效率 = 荧光显微镜下荧光阳性细胞数 / 同一视野普通光学显微镜下细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 半定量 RT-PCR 法测定细胞中 CFB mRNA 的相对表达 胰蛋白酶消化并收集转染后 48 h 的各组细胞, 10 ml PBS 漂洗 1 次, 按照 Mini RNAeasy 试剂盒说明提取细胞总 RNA; 取 13 μ l RNA 作为模板, 以 oligdT 为引物, 逆转录合成 cDNA, 置于 -20 °C 冰箱保存。CFB 上游引物为 5'-GAGTACTTCGTGCTGACAGCAG-3', 下游引物为 5'-GCGGCTTCTCTTGTGAACAA TG-3'。质量分数 1.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 数码照相, 以 β -actin 作为内参照, 并采用 Band Leader 凝胶图像分析软件进行灰度值分析。每组平行测 2 次, 重复操作 4 次。

1.2.4 MTT 法测定细胞活性 将转染后 48 h 细胞进行计数, 按 1×10^3 /孔接种于 96 孔板, 每组 3 个复孔, 分别在接种后 12、24、48、72 h 采用 MTT 法检测各组波长 570 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞的生长抑制率。生长抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$, 其中 $A_{\text{对照}}$ 为空白对照组样品 A 值, $A_{\text{实验}}$ 为待测样品 A 值。

1.2.5 流式细胞仪检测 CFB-siRNA 对 ECV-304 增生周期的影响 质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化电转后 48 h 的细胞, 离心后加入体积分数 70% 乙醇, 并吹打成单细胞悬液, 4 °C 保存, 流式细胞仪检测。每组平行测 3 管, 重复操作 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SAS 统计学软件 (SAS institute Inc) 进行统计分析。本研究中测量指标的计量资料经 W 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间细胞 CFB mRNA 相对表达量和细胞转染后 ECV-304 增生周期变化的比较采用单因素方差分析, 各组细胞转染后不同时间点 ECV-304 抑制率的比较采用重复测量两因素方差分析, 多重比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 CFB-siRNA 真核表达载体的构建及鉴定

将 CFB-siRNA 定向插入到 pRNAT-U6.1 的 BamH I 和 Hind III 内切酶位点, DNA 序列测定结果显示目标序列与设计序列完全相同, 表明人 CFB-siRNA 真核表达载体构建成功。BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定结果见图 1。

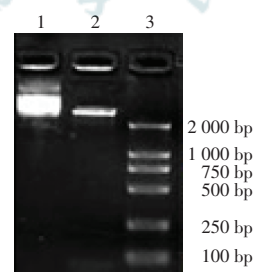


图 1 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定结果 1: 未经双酶切的 CFB-siRNA 载体; 2: 经双酶切的 CFB-siRNA 载体; 3: Marker DL2000

2.2 各组细胞 CFB mRNA 的相对表达量

2.2.1 质粒转染效率 荧光显微镜下可见 CFB-siRNA 转染组和空质粒转染组的 ECV-304 细胞中呈清晰的绿色荧光, 验证转染成功, CFB-siRNA 转染组质粒转染效率达到 75% 以上 (图 2)。

2.2.2 各组细胞中 CFB mRNA 的相对表达量 CFB-siRNA 转染组、空质粒转染组及空白对照组间细胞中 CFB mRNA 的相对表达量明显不同, 差异有统计学意义。

义 ($F = 233.05, P = 0.00$), 其中 CFB-siRNA 转染组细胞中 CFB mRNA 相对表达量明显低于空质粒转染组和空白对照组 (均 $P < 0.05$); 空质粒转染组与空白对照组比较, 细胞中 CFB mRNA 的相对表达量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3, 表 1)。

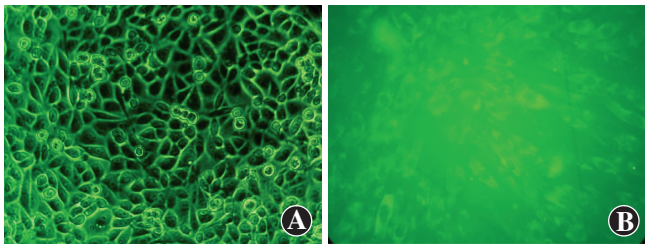


图 2 载体对 ECV-304 细胞的电转染效率 (GFP × 400) A: CFB-siRNA 转染组 B: 空质粒转染组

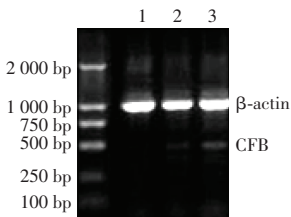


图 3 各组细胞 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图 1: CFB-siRNA 转染组 2: 空质粒转染组 3: 空白对照组 β-actin: β-肌动蛋白; CFB: 补体因子 B

表 1 各组细胞 CFB mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CFB mRNA
CFB-siRNA 转染组	8	0.07 ± 0.04
空质粒转染组	8	0.14 ± 0.02 ^a
空白对照组	8	0.14 ± 0.03 ^a
<i>F</i>		233.05
<i>P</i>		0.00

注: 与 CFB-siRNA 转染组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) CFB: 补体因子 B; siRNA: 小干扰 RNA

2.3 各组 ECV-304 细胞的抑制率

各组不同时间细胞增生抑制率总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 212.99, P = 0.00$), 其中 CFB-siRNA 转染组在 24、48 和 72 h 对 ECV-304 细胞的抑制率分别为 (23.45 ± 0.01)%、(33.48 ± 0.02)% 和 (45.49 ± 0.01)%, 明显高于同时间点空质粒转染组和空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组 ECV-304 细胞转染后不同时间点抑制率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	不同培养时间点细胞生长抑制率		
		24 h	48 h	72 h
CFB-siRNA 转染组	9	23.45 ± 0.01	33.48 ± 0.02	45.49 ± 0.01
空质粒转染组	9	-18.18 ± 0.01 ^a	-21.80 ± 0.01 ^a	-23.63 ± 0.01 ^a
空白对照组	9	-19.11 ± 0.01 ^a	-23.14 ± 0.01 ^a	-35.41 ± 0.01 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 212.99, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 355.74, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 317.33, P = 0.00$. 与各自时间点的 CFB-siRNA 转染组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) CFB: 补体因子 B; siRNA: 小干扰 RNA

2.4 各组细胞转染后 ECV-304 细胞周期的变化

流式细胞仪检测结果显示, 空白对照组、空质粒转染组和 CFB-siRNA 转染组处于 G₁ 期的细胞数占总细胞数的百分比分别为 (27.9 ± 0.6)%、(25.8 ± 0.4)% 和 (44.4 ± 0.5)%, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 58.98, P = 0.00$), CFB-siRNA 转染组、空白对照组和空质粒转染组 G₂ 期、S 期的细胞周期数比较, 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 35.74, P = 0.00; F = 101.92, P = 0.00$)。CFB-siRNA 转染组 G₁ 期和 G₂ 期细胞所占百分比显著高于空白对照组和空质粒转染组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

表 3 各组 ECV-304 细胞增生周期百分比的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	各细胞周期细胞百分比		
		G ₁ 期	G ₂ 期	S 期
CFB-siRNA 转染组	9	44.4 ± 0.5	28.9 ± 0.9	24.2 ± 0.4
空质粒转染组	9	25.8 ± 0.4 ^a	15.1 ± 0.6 ^a	57.4 ± 0.6 ^a
空白对照组	9	27.9 ± 0.6 ^a	19.6 ± 0.7 ^a	48.7 ± 0.3 ^a
<i>F</i>		58.98	35.74	101.92
<i>P</i>		0.00	0.00	0.00

注: 与各自 CFB-siRNA 转染组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) CFB: 补体因子 B; siRNA: 小干扰 RNA

3 讨论

CNV 可发生于许多眼部疾病, 近年来研究认为补体系统在 CNV 的发病机制中起着重要的作用^[5]。研究表明, 编码调控蛋白的基因 CFB 和补体 C2 在年龄相关性黄斑变性中发挥作用的生物学途径与 CFH 相同^[11-12]。目前关于治疗 CNV 的研究多集中在 VEGF 的抑制或其他血管生长促进因子的抑制方面, 但这种方法仅能一定程度地抑制 CNV 的生长。新生血管的生成是一个多因子、多种信号途径共同参与的复杂过程, 如果把治疗的靶点放在其中某个因子的抑制上, 其治疗效果是有限的。在 CNV 形成的过程中, 补体活化旁路途径是多种血管生长因子表达失衡的根本原因, 因此我们推测阻断补体活化的旁路途径可抑制多种促新生血管生长因子的表达, 达到抗新生血管生成的目的, 其疗效优于以往的治疗方法, 而补体活化旁路途径中最重要的因子 CFB 就成为阻断旁路途径的靶点。

CFB 在体内多种组织, 包括血管内皮细胞中均有表达^[13]。正常情况下, 体外培养的血管内皮细胞在无胎牛血清的环境中无法生存^[14], 但是研究发现维持内皮细胞活性的因子存在, 这类因子简称为 EC-VMF (endothelial cell-viability maintaining factor), 有 EC-VMFa 和 EC-VMFb 2 种亚型, 后者是 CFB 的分裂片段

Bb。Cai 等^[15]证明当 CFB 或 Bb 存在时,在无胎牛血清培养液培养的血管内皮细胞可以继续存活至少 5 d,少部分细胞可增生,表明 CFB 对血管内皮细胞有保护作用 and 潜在的刺激增生作用,其机制尚有待研究。根据 CFB 的分布特点和 CNV 的形成机制,本研究中采用人脐静脉内皮细胞 ECV-304 作为体外实验的靶细胞,结果显示 CFB 的表达被沉默后 ECV-304 细胞生长被阻滞在 G₁ 期,并有效抑制 ECV-304 的增生,从反面证实了 CFB 对血管内皮细胞的增生有一定的促进作用。

siRNA 的体外制备包括化学合成^[16]、酶消化法^[17]和体外转录法^[18]。本研究中采用了体外转录法,此方法合成的 siRNA 具有毒性小、效率高、合成速度快的特点,适用于筛选最有效的 siRNA。本研究中设计了针对 CFB 的 siRNA 序列,成功构建了重组质粒 pRNAT-U6.1/CFB siRNA,该质粒载体含有 CMV 启动子,启动其下游基因 GFP 的表达,以便进行荧光检测来评价质粒转染情况;该质粒同时含有 BamH I 和 Hind III 酶切位点,以便连入 CFB-siRNA,构建目标载体,双酶切位点上游含有真核细胞 H I 启动子,可以启动 CFB-siRNA 表达;同时,该质粒上含有氨苄青霉素抗性基因,可进行载体构建后的氨苄青霉素抗性克隆挑选,保证构建质粒的纯度。另外,本研究中通过电转染的方式成功地将重组质粒转染 ECV-304 细胞,弥补了传统脂质体转染效率低的缺陷。

补体系统激活的 3 条途径都需要补体 C3 参与,C3 转化酶的形成是补体活化过程中的核心环节。CFB 是旁路途径的特异性因子,在补体激活的旁路途径中,CFB 与 C3b 结合形成 C3 转化酶,进一步引起后续“瀑布”反应。在多种自身免疫性疾病中,CFB 与 C3b 的结合能力改变,进而影响 C3 转化酶的稳定性,最终引起旁路途径异常^[19]。CFB 参与形成旁路途径的 C3 转化酶是补体旁路途径中重要的上游调控因子,研究 CFB 对血管生长因子的调控作用,可以为研究 CNV 的发病机制提供新思路。

本研究中尚存在以下问题:在转染过程中,质粒与细胞数量比、转染时间等未进一步研究,虽然所选浓度和时间点的转染效果和抑制效果均较好,但未能反映一个渐进的过程,有待于寻找更优的转染条件。未来我们将利用该重组质粒进行动物水平的实验研究,检测其抑制 CFB 后 CNV 的生长情况,进一步探讨 CFB 与 CNV 发生和发展的关系。

参考文献

[1] Kaiser RS, Gupta OP, Regillo CD, et al. Ranibizumab for eyes

previously treated with pegaptanib or bevacizumab without clinical response[J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2012, 43 (1): 13-19. doi:10.3928/15428877-20111006-01.

- [2] Puche N, Glacet A, Mimoun G, et al. Intravitreal ranibizumab for macular oedema secondary to retinal vein occlusion: a retrospective study of 34 eyes[J]. *Acta Ophthalmol*, 2012, 90 (4): 357-361. doi:10.1111/j.1755-3768.2010.01913.x.
- [3] Campa C, Costagliola C, Incorvaia C, et al. Inflammatory mediators and angiogenic factors in choroidal neovascularization: pathogenetic interactions and therapeutic implications[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 546826 [2015-01-25]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943126. doi:10.1155/2010/546826.
- [4] Zhang M, Zhang J, Yan M, et al. A phase 1 study of KH902, a vascular endothelial growth factor receptor decoy, for exudative age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2011, 118 (4): 672-678. doi:10.1016/j.ophtha.2010.08.008.
- [5] Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, et al. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization[J]. *J Immunol*, 2005, 174(1): 491-497. doi:10.4049/jimmunol.174.1.491.
- [6] Bora NS, Kaliappan S, Jha P, 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. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1872.
- [7] 许琴,肖煜晨.补体和膜攻击复合物在脉络膜新生血管形成中的作用[J]. *眼科新进展*, 2011, 31(3): 232-230. doi:10.13389/j.cnki.rao.2011.03.022.
- [8] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-strand RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811. doi:10.1038/35888.
- [9] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200. doi:10.1101/gad.862301.
- [10] Ashikari M, Tokoro M, Itaya M, et al. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by nontargeted siRNA[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(7): 3820-3824. doi:10.1167/iovs.09-5121.
- [11] Gold B, Merriam JE, Zernant J, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(4): 458-462. doi:10.1038/ng1750.
- [12] Buschini E, Piras A, Nuzzi R, et al. Age related macular degeneration and drusen; neuroinflammation in the retina[J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 95(1): 14-25. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.05.011.
- [13] Ripoche J, Mitchell JA, Erdei A, et al. Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture[J]. *J Exp Med*, 1988, 168(5): 1917-1922.
- [14] Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis[J]. *Lab Invest*, 1991, 65(3): 334-346.
- [15] Cai G, Satoh T, Hoshi H. Isolation from fetal bovine serum of a fragment b of complement factor B-like protein improving a long-term survival of human endothelial cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 345(1): 150-155. doi:10.1006/abbi.1997.0234.
- [16] Micura R. Small interfering RNAs and their chemical synthesis[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41(13): 2265-2269.
- [17] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553. doi:10.1126/science.1068999.
- [18] Myers JW, Jones JT, Meyer T, et al. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 324-328. doi:10.1038/nbt792.
- [19] Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, et al. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2328-2333. doi:10.1016/j.ajo.2006.05.010.

(收稿日期:2015-02-11)

(本文编辑:刘艳 张宇)