

# 大鼠 IκBα 基因 siRNA 序列的体外筛选及体内验证

曾睿<sup>1</sup>, 蓝育青<sup>1</sup>, 宫海军<sup>1</sup>, 张弛<sup>2</sup>, 李金苗<sup>1</sup>

基金项目:广东省科技计划项目(No. 2011B031800158);广州市科技计划项目(No. 201300000149)

作者单位:<sup>1</sup>(510000)中国广东省广州市,中山大学孙逸仙纪念医院眼科;<sup>2</sup>(528000)中国广东省佛山市第一人民医院眼科

作者简介:曾睿,在读硕士研究生,研究方向:青光眼防治。

通讯作者:蓝育青,博士,教授,主任医师,研究方向:青光眼防治. lyqglp@163.com

收稿日期:2014-03-23 修回日期:2014-05-04

## In vitro screening and in vivo identification of rat IκBα-siRNA

Rui Zeng<sup>1</sup>, Yu-Qing Lan<sup>1</sup>, Hai-Jun Gong<sup>1</sup>, Chi Zhang<sup>2</sup>, Jin-Miao Li<sup>1</sup>

**Foundation items:** Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (No. 2011B031800158); Science and Technology Planning Project of Guangzhou, Guangdong Province, China (No. 201300000149)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Yu-Qing Lan. Department of Ophthalmology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China. lyqglp@163.com  
Received:2014-03-23 Accepted:2014-05-04

## Abstract

• **AIM:** To seek a small interfering RNA (siRNA) sequence targeting rat inhibitor of nuclear factor kappa B α (IκBα) that can specifically and effectively suppress IκBα mRNA expression of rat ciliary muscles *in vivo*.

• **METHODS:** Three IκBα specific double stranded siRNAs were designed and synthesized. They were transfected into rat A7r5 cells which express IκBα gene. Flow cytometry was used to assess transfected efficiency. The mRNA and protein levels of IκBα were examined by Real Time quantitative polymerase chain reaction (Real Time-PCR) and western blot to screen a candidate valid sequence with the highest inhibitory rate. The Cy3 labeled non-specific control siRNA or the candidate valid siRNA was then injected into rat anterior chamber. Distribution of Cy3-siRNA in rat ciliary muscles was viewed by fluorescence microscopy, and the inhibitory effect *in vivo* of the valid siRNA was identified *via* Real Time-PCR and immunofluorescence.

• **RESULTS:** The suppression effect of the siRNA targeting the CTACGATGACTGTGTGTTT of IκBα gene

was most obvious by *in vitro* screening. By anterior chamber injection, this valid siRNA could reach rat ciliary muscles and effectively suppress IκBα gene expression with the highest inhibitory rate of 59.0% on mRNA level at 24h after RNAi, and 52.3% on protein level at 72h after RNAi ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** It proves that the siRNA targeting the CTACGATGACTGTGTGTTT of IκBα gene is the valid sequence to suppress rat IκBα expression of ciliary muscles by RNAi *in vivo*.

• **KEYWORDS:** IκBα; small interfering RNA; rat ciliary muscles; glaucoma; uveoscleral outflow route

**Citation:** Zeng R, Lan YQ, Gong HJ, et al. *In vitro* screening and *in vivo* identification of rat IκBα-siRNA. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(6):986-991

## 摘要

**目的:**寻找可在体内有效抑制大鼠睫状肌核转录因子 κB 抑制物 α (IκBα) 基因表达的小干扰 RNA (siRNA) 序列。

**方法:**设计合成 3 个针对大鼠 IκBα 基因的 siRNA, 体外转染表达 IκBα 基因的大鼠 A7r5 细胞, 通过流式细胞仪检测转染效率, 并经 Real Time-PCR 及 western blot 在 mRNA 及蛋白水平筛选对 IκBα 表达抑制率最高的序列。通过前房注射选出的 siRNA 进行大鼠体内转染, 荧光显微镜下观察其在大鼠睫状肌的分布并利用 Real Time-PCR 及免疫荧光验证其对该部位 IκBα 基因沉默的有效性。

**结果:**体外筛选证明针对大鼠 IκBα 基因 CTACGATGACTGTGTGTTT 靶序列的 siRNA 对 IκBα 的表达抑制效果最明显, 大鼠前房注射该 siRNA 可到达睫状肌, 并能有效抑制该部位 IκBα 基因的表达, IκBα mRNA 水平在转染后 24h 降低最明显, 抑制率达 59.0%, 而蛋白水平则在 72h 达最低, 抑制率为 52.3% ( $P < 0.01$ )。

**结论:**针对大鼠 IκBα 基因 CTACGATGACTGTGTGTTT 靶序列的 siRNA 是对大鼠睫状肌 IκBα 基因进行体内 RNA 干扰的有效序列。

**关键词:**IκBα; 小干扰 RNA; 大鼠睫状肌; 青光眼; 葡萄膜巩膜房水流出通道

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.06.02

**引用:**曾睿, 蓝育青, 宫海军, 等. 大鼠 IκBα 基因 siRNA 序列的体外筛选及体内验证. *国际眼科杂志* 2014;14(6):986-991

## 0 引言

青光眼 (glaucoma) 被世界卫生组织列为世界第二位不可逆性致盲眼病, 房水流出障碍引起眼压升高是青光眼发病的主要因素。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 可以增加葡萄膜巩膜通道房水外

表1 大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$  基因 siRNA 序列

I $\kappa$ B $\alpha$ -siRNA 编号	靶序列	siRNA 序列
No. 1	CCATGAAGGACGAGGATTA	5' CCAUGAAGGACGAGGAUUA dTdT 3' 5' UAAUCCUCGUCCUUCUUGG dTdT 3'
No. 2	CCATGGAAGTGATTGGTCA	5' CCAUGGAAGUGAUUGGUCA dTdT 3' 5' UGACCAAUCACUCCUUGG dTdT 3'
No. 3	CTACGATGACTGTGTGTTT	5' CUACGAUGACUGUGUGUUU dTdT 3' 5' AAACACACAGUCAUCGUAG dTdT 3'

流<sup>[1]</sup>,但其上游分子调控机制尚不清楚。核转录因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 是近年发现的一种重要的转录因子,广泛存在于多种细胞,它与其抑制物 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 共同组成 NF- $\kappa$ B 系统,参与炎症、免疫、细胞增殖与凋亡等多种生理、病理过程<sup>[2]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$  是 I $\kappa$ B 家族中发现最早和研究最清楚的成员,我们已通过体外实验证实应用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术下调正常人眼睫状肌细胞 I $\kappa$ B $\alpha$  表达可导致 NF- $\kappa$ B 激活,进而增加 MMP-2 的表达<sup>[3]</sup>。为进一步进行动物体内研究,本实验设计合成 3 对大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$  基因的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 并转染大鼠 A7r5 细胞,通过 Real Time-PCR 及 western blot 检测 I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达,筛选能有效抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  基因表达的 siRNA 序列,并通过体内转染验证其在大鼠睫状肌的有效性,为进一步在动物体内探究 I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 系统对青光眼葡萄膜巩膜房水流出通道的作用打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞及实验动物** A7r5 大鼠胸主动脉平滑肌细胞 (ATCC 细胞库);排除眼部疾病、SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 (200 ~ 250g) 65 只 (中山大学实验动物中心)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 胎牛血清 (杭州四季青生物制品公司), 0.25% 胰蛋白酶 (Hyclone), Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent、DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基及 PBS 液 (Invitrogen), RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂、PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit 及 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒 (Takara), DAPI, RIPA, PMSF, SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (碧云天生物技术公司), BCA 蛋白定量分析试剂盒、ECL 化学发光底物 (Thermo), 小鼠抗大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$ -actin 单克隆抗体 (CST), HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (Abcam), FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (武汉博士德生物有限公司);流式细胞仪 FACS Aria (BD), LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche), 微量进样器 (Hamilton), 冰冻切片仪、荧光显微镜 (Leica), 电泳仪、转膜仪 (Bio-rad)。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$  基因 siRNA 的设计与合成** 查询美国国立生物技术信息中心 NCBI 基因库中大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$  基因 (NM\_001105720) mRNA 序列,由广州锐博生物公司设计并化学合成 3 对针对 I $\kappa$ B $\alpha$  基因的 siRNA (表 1) 及一对非靶向性的阴性对照 Non-specific Control siRNA (NC-siRNA)。另外各合成一对末端带 Cy3 或 Cy5 标记的阴性对照 siRNA (序列与未标记 NC-siRNA 相同),长度均为 21bp。

**1.2.2 细胞转染效率的优化** 分为 50, 70, 100nmol/L 3 个 siRNA 终浓度转染组,在 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO<sub>2</sub> 的培养箱

中用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 A7r5 细胞,取对数生长期细胞,0.25% 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,以每孔约 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个接种于 6 孔培养板,待细胞融合度达 40% ~ 50%,根据 Lipofectamine 2000 操作指南,分别用 Opti-MEM 稀释 Cy5 标记的 NC-siRNA 及 Lipofectamine 2000,二者混合 20min 后转染入细胞,培养箱中培养 4h 后弃去转染混合液,加入完全培养液后置于 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养。24h 后,按常规方法消化 6 孔板中细胞,制成单细胞悬液,1000r/min 离心 5min,弃上清,PBS 液重悬细胞,运用流式细胞仪检测转染效率。

**1.2.3 细胞转染** 实验分为 5 组:对照组 (Control) 只加转染试剂,不加任何 siRNA;阴性对照组 (NC) 转染 NC-siRNA;实验组 (No. 1, 2, 3) 转染针对 I $\kappa$ B $\alpha$  基因的 3 对 siRNA。以筛选出的 siRNA 终浓度 (100nmol/L),按照 1.2.2 中转染步骤进行细胞转染后置于 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱待进一步检测。

**1.2.4 体内转染** 将 Wistar 大鼠随机分为 4 组:空白对照组 (PBS) 注射 10 $\mu$ L PBS 液,转染试剂组 (Lipo) 注射等量转染试剂 Lipofectamine 2000,阴性对照组 (NC) 注射 5 $\mu$ g NC-siRNA 与 1.5 $\mu$ L Lipofectamine 2000 的复合物,实验组 (I $\kappa$ B $\alpha$ -siRNA) 注射 5 $\mu$ g No. 3 I $\kappa$ B $\alpha$ -siRNA 与 1.5 $\mu$ L Lipofectamine 2000 的复合物,每组 15 只大鼠。100g/L 水合氯醛按 0.3mL/100g 腹腔注射麻醉大鼠,5g/L 盐酸丙美卡因点眼表面麻醉,手术显微镜直视下用微量进样器自角膜缘向前房注射 10 $\mu$ L 上述溶液后常规喂养,待进一步检测。

**1.2.5 Cy3 标记 siRNA 在大鼠睫状肌的分布情况** 按上述转染步骤,前房注射 5 $\mu$ g Cy3 标记的 NC-siRNA 与 1.5 $\mu$ L Lipofectamine 2000 的复合物 10 $\mu$ L,24h 后过量麻醉处死大鼠,取眼球,OCT 包埋剂包埋,制作厚度为 7 $\mu$ m 的冰冻切片,40g/L 多聚甲醛固定,DAPI 染核后,在荧光显微镜下观察 Cy3 红色荧光在大鼠睫状肌的分布情况,并以前房注射 PBS 液为对照。

**1.2.6 Real Time-PCR 检测 I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 表达** 细胞转染后 24h 以及体内转染后 24, 48, 72h,用 RNAiso Plus 试剂盒分别提取各组细胞/大鼠睫状体总 RNA,采用紫外分光光度法测定 RNA 样品的浓度和纯度,参照 Takara 公司 RT 试剂盒将各组总 RNA 逆转录生成 cDNA,利用 SYBR Green I 染料实时定量 PCR 试剂盒检测各组 I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 水平。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30s,95 $^{\circ}$ C 变性 5s,60 $^{\circ}$ C 退火 31s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$  及 GAPDH 引物均由大连宝生物工程有限公司 (Takara 公司)设计合成,并在 BLAST 上进行同源性分析 (表 2)。用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算和分析 I $\kappa$ B $\alpha$  基因 mRNA 的相对表达量<sup>[4]</sup>。

表2 IκBα 和 GAPDH 引物序列

扩增产物	引物序列(5'-3')	产物长度
IκBα	上游引物 TGACCATGGAAGTGATTGGTCAG	95bp
	下游引物 GATCACAGCCAAGTGGAGTGGGA	
GAPDH	上游引物 GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	143bp
	下游引物 ATGGTGGTGAAGACGCCACTA	

1.2.7 Western blot 检测 A7r5 细胞 IκBα 蛋白表达 细胞转染后 48h, 收集各组细胞加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 每泳道上样 30μg 蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 将蛋白转至 PVDF 膜, 用 5% BSA 室温封闭 1h, 然后分别与小鼠抗大鼠 IκBα 单克隆抗体(1:1000)或小鼠抗大鼠 β-actin 单克隆抗体(1:2000)作用, 4℃ 过夜孵育, PBS 液洗膜后, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:10000), 室温孵育 1h, PBS 液洗膜, 化学发光, 显影, 定影。Image-J 软件分析各条带灰度值, 计算 IκBα 蛋白相对表达量。

1.2.8 免疫荧光检测大鼠睫状肌 IκBα 蛋白表达 体内转染后 24, 48, 72h, 过量麻醉处死大鼠, 取眼球, OCT 包埋剂包埋, 制作厚度为 7μm 的冰冻切片, 40g/L 多聚甲醛固定, 正常山羊血清室温封闭 1h, 滴加一抗: 小鼠抗大鼠 IκBα 单克隆抗体(1:100), 4℃ 过夜孵育, 滴加 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(1:50), 室温孵育 2h, DAPI 染核 5min, 抗荧光淬灭剂封片, 在荧光显微镜下观察。应用 Image-Pro plus 专业图像分析软件对大鼠睫状肌中 IκBα 的荧光强度做定量测定: 每只眼球随机抽取 5 张切片, 测其累计光密度(IOD)及所选有效区域的面积(area), 二者相除得到平均光密度(mean density), 作为荧光强度测量值。

统计学分析: 数据经 SPSS 13.0 软件行统计学分析, 所有数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 各组指标比较采用单因素方差分析, 均数之间两两比较采用 LSD-t 检验, 显著性检验水平  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 体外筛选抑制大鼠 IκBα 基因表达的有效 siRNA 序列

2.1.1 细胞转染效率的检测 Cy5 标记的 NC-siRNA 以终浓度为 50, 70, 100nmol/L 转染 A7r5 细胞 24h 后, 运用流式细胞仪检测其转染效率分别为 39.4%, 42.6%, 53.4% (图 1), 100nmol/L 终浓度转染效率最高, 因此以其作为后续细胞转染的 siRNA 浓度。

2.1.2 RNAi 后 IκBα mRNA 及蛋白表达情况 IκBα/NC-siRNA 均以 100nmol/L 的终浓度转染 A7r5 细胞, 于转染后 24, 48h 分别通过 Real Time-PCR 及 western blot 检测 IκBα mRNA 及蛋白表达情况, 筛选对大鼠 IκBα 基因抑制率最高的 siRNA 序列。结果显示, 在 mRNA 及蛋白水平, 各实验组 IκBα 的表达量均较 Control 组及 NC 组明显减少 ( $P < 0.01$ ), 而 NC 组与 Control 组之间比较无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (图 2, 3, 表 3)。表明 3 对 siRNA 对 IκBα 基因均有抑制作用, 其中 No. 3 抑制作用较其余 2 对强 ( $P < 0.01$ ), 抑制率在 mRNA 水平达 83.7%, 在蛋白水平达 78.3%, 因此, 选用 No. 3 IκBα-siRNA 做后续动物实验。

2.2 Cy3 标记 siRNA 在大鼠睫状肌的分布情况 前房注射 Cy3 标记的 NC-siRNA, 观察其在大鼠睫状肌的分布情况。注射后 24h 处死大鼠, 取眼球制作冰冻切片, 荧光显微镜下可见大鼠睫状肌有较多红色荧光聚集(图 4A), 角膜内皮未见荧光分布(图 4B)。而 PBS 对照组睫状肌未见红色荧光(图 4C)。

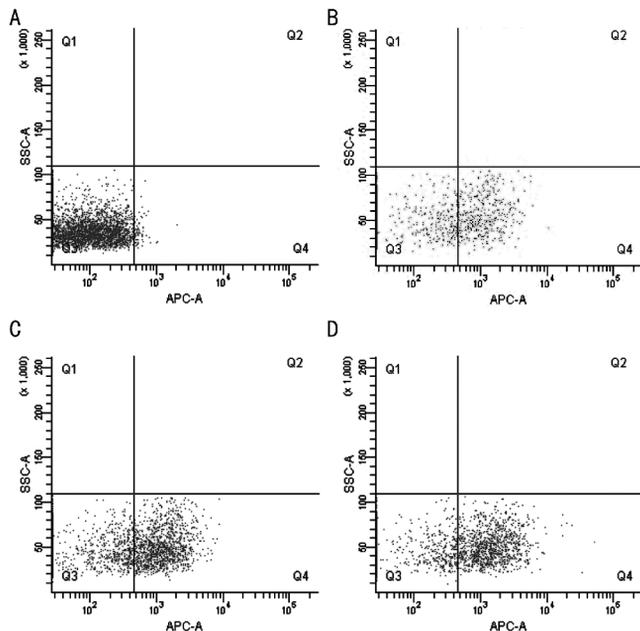


图1 流式细胞仪检测不同 siRNA 终浓度的转染效率 (Q4 表示带 Cy5 细胞的数目) A: 对照组; B: 终浓度为 50nmol/L; C: 终浓度为 70nmol/L; D: 终浓度为 100nmol/L。

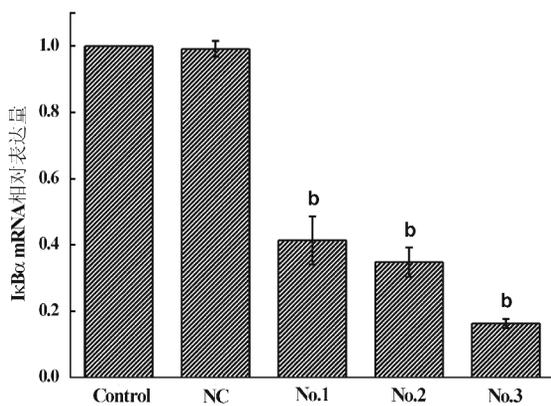


图2 转染 siRNA 后 IκBα mRNA 的相对表达量 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Control 组及 NC 组。

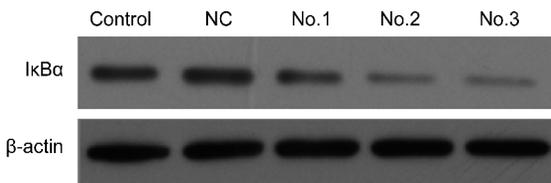


图3 转染 siRNA 后 IκBα 蛋白的表达。

表3 转染 siRNA 后 IκBα mRNA 及蛋白的相对表达量  $\bar{x} \pm s$

组别	IκBα mRNA	IκBα 蛋白
Control	1	1
NC	0.9915±0.0244	1.0933±0.1002
No.1	0.4133±0.0724 <sup>b</sup>	0.6267±0.0777 <sup>b</sup>
No.2	0.3477±0.0440 <sup>b</sup>	0.3367±0.0351 <sup>b</sup>
No.3	0.1628±0.0142 <sup>b</sup>	0.2167±0.0379 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Control 组及 NC 组。

2.3 体内验证 No. 3 IκBα-siRNA 对大鼠睫状肌 IκBα 基因沉默的有效性

前房注射 5μg No. 3 IκBα/NC-siRNA 与 1.5μL Lipofectamine 2000 的复合物转染大鼠睫状肌, 并以注射 PBS 液及转染试剂为对照, 分别于转染后 24, 48, 72h

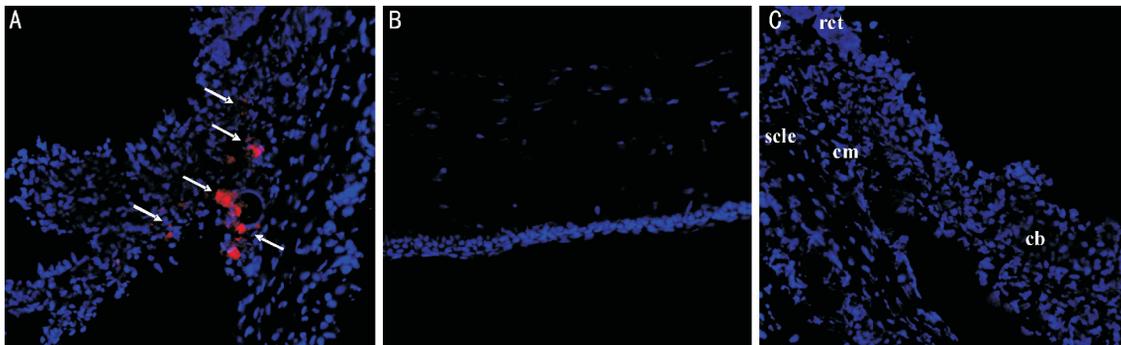


图4 大鼠前房注射 Cy3 标记 siRNA 在睫状肌的分布 (DAPI 染色×200) A: Cy3-siRNA 组,睫状肌可见 Cy3-siRNA 红色荧光分布(箭头指示);B: Cy3-siRNA 组角膜内皮未见红色荧光分布。细胞核为蓝色荧光(DAPI 染色);C: PBS 组,cb:ciliary body 睫状体,cm:ciliary muscle 睫状肌,ret:retina 视网膜,scl:sclera 巩膜。

行 Real Time-PCR 及免疫荧光检测 IκBα mRNA 及蛋白的表达,验证 No. 3 IκBα-siRNA 在体内的抑制作用。结果显示,各时间点 IκBα-siRNA 组 IκBα mRNA 及蛋白的表达量均较 PBS 组、Lipo 组及 NC 组明显减少 ( $P < 0.01$ ),而 PBS 组、Lipo 组及 NC 组之间比较无明显差异 ( $P > 0.05$ )。24, 48, 72h mRNA 水平抑制率分别为 59.0%、44.7% 及 36.9%;蛋白水平抑制率分别为 18.5%、39.0% 及 52.3% (图 5,图 6,表 4,表 5)。表明 No. 3 IκBα-siRNA 在体内也可有效抑制大鼠睫状肌 IκBα 基因的表达。

### 3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种双链 RNA 分子在 mRNA 水平关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程,是序列特异性转录后基因沉默,其中 21-23nt 的 siRNA 是 RNAi 的重要效应分子<sup>[5]</sup>。RNAi 最早是在植物中发现的一种自然现象,而由于其具有高效、高特异性、作用稳定且操作简单等特点,目前已作为一强有力的工具被广泛地运用于细胞内信号传导途径的分子和生化机制研究。

RNAi 技术有 siRNA 设计与合成、序列有效性的体外实验验证和体内实验等重要环节<sup>[6]</sup>。本实验针对大鼠 IκBα mRNA 不同靶序列设计并合成 3 对 siRNA,首先通过体外转染对 3 对 siRNA 序列的有效性进行筛选。原代培养睫状肌细胞取材多来源于人<sup>[7]</sup>,也见于猴<sup>[8]</sup>和兔<sup>[9]</sup>,但未查到来源于鼠的相关报道,可能与鼠睫状肌较小,相对于前三者不易取材培养有关。查询 ATCC 细胞库未查到大鼠睫状肌细胞株收录,而大鼠 A7r5 细胞与睫状肌细胞同属于平滑肌细胞,其表达 IκBα 蛋白且易于转染<sup>[10]</sup>,因此本研究选用 A7r5 细胞来进行大鼠 IκBα-siRNA 的体外筛选。运用流式细胞技术优化转染效率后,利用 Lipofectamine 2000 将各 siRNA 按选出的最佳终浓度 100nmol/L 转染入 A7r5 细胞,经 Real Time-PCR 及 western blot 检测 mRNA 及蛋白水平的干扰效果,结果显示 3 对 siRNA 对 IκBα mRNA 及蛋白表达均有抑制作用,其中针对 CTACGATGACTGTGTGTTT 靶序列的 No. 3 IκBα-siRNA 抑制效果最明显。

在青光眼葡萄膜巩膜房水流出通道中,睫状肌张力及其细胞外基质的重塑对房水流出起不可忽视的作用<sup>[11,12]</sup>。MMPs 可以降解睫状肌细胞外基质,分解胶原,从而促进房水流出,因此我们选择睫状肌作为研究的靶部位,通过体内转染 No. 3 IκBα-siRNA 至大鼠睫状肌来对该

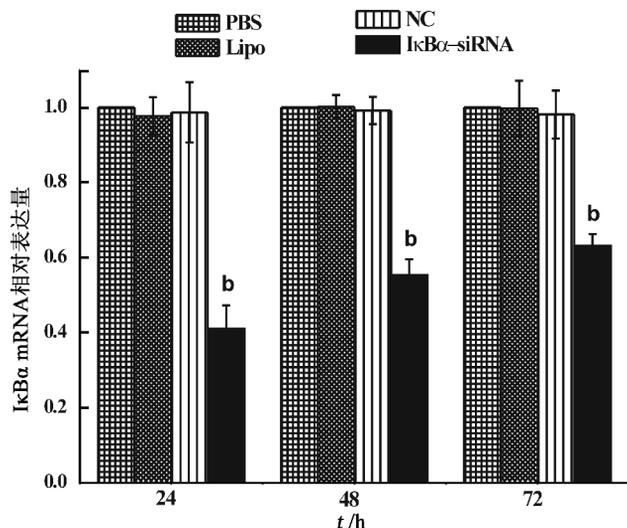


图5 前房注射 siRNA 后 IκBα mRNA 的相对表达量  $^b P < 0.01$  vs PBS 组、Lipo 组及 NC 组。

表4 前房注射 siRNA 后 IκBα mRNA 的相对表达量  $\bar{x} \pm s$

组别	24h	48h	72h
PBS	1	1	1
Lipo	0.9767±0.0503	1.0017±0.0313	0.9973±0.0740
NC	0.9867±0.0802	0.9917±0.0362	0.9812±0.0642
IκBα-siRNA	0.4100±0.0625 <sup>b</sup>	0.5531±0.0423 <sup>b</sup>	0.6311±0.0312 <sup>b</sup>

$^b P < 0.01$  vs PBS 组、Lipo 组及 NC 组。

表5 前房注射 siRNA 后 IκBα 蛋白的表达量  $\bar{x} \pm s$

组别	24h	48h	72h
PBS	0.0709±0.0023	0.0708±0.0017	0.0707±0.0013
Lipo	0.0714±0.0021	0.0712±0.0010	0.0709±0.0017
NC	0.0708±0.0026	0.0709±0.0012	0.0718±0.0015
IκBα-siRNA	0.0578±0.0027 <sup>b</sup>	0.0432±0.0018 <sup>b</sup>	0.0337±0.0021 <sup>b</sup>

$^b P < 0.01$  vs PBS 组、Lipo 组及 NC 组。

siRNA 的有效性进行验证。2006 年 Bloquel 等<sup>[13]</sup>首次将睫状肌作为基因转染靶部位,通过睫状肌注射并辅助电转移的方式将表达肿瘤坏死因子 α 可溶性受体(hTNFR-Is)的嵌合质粒导入内毒素诱导葡萄膜炎的大鼠睫状肌,在房水中检测到了相应蛋白的分泌,并显著地抑制了葡萄膜炎,而单纯睫状肌注射则转染效果较差。Kowalczyk 等<sup>[14]</sup>也利用超声微泡介导成功转染质粒至大鼠睫状肌。

虽然电转移和超声微泡都可有效提高基因的转染率,但均会对组织造成一定损伤和破坏。脂质体是应用较为

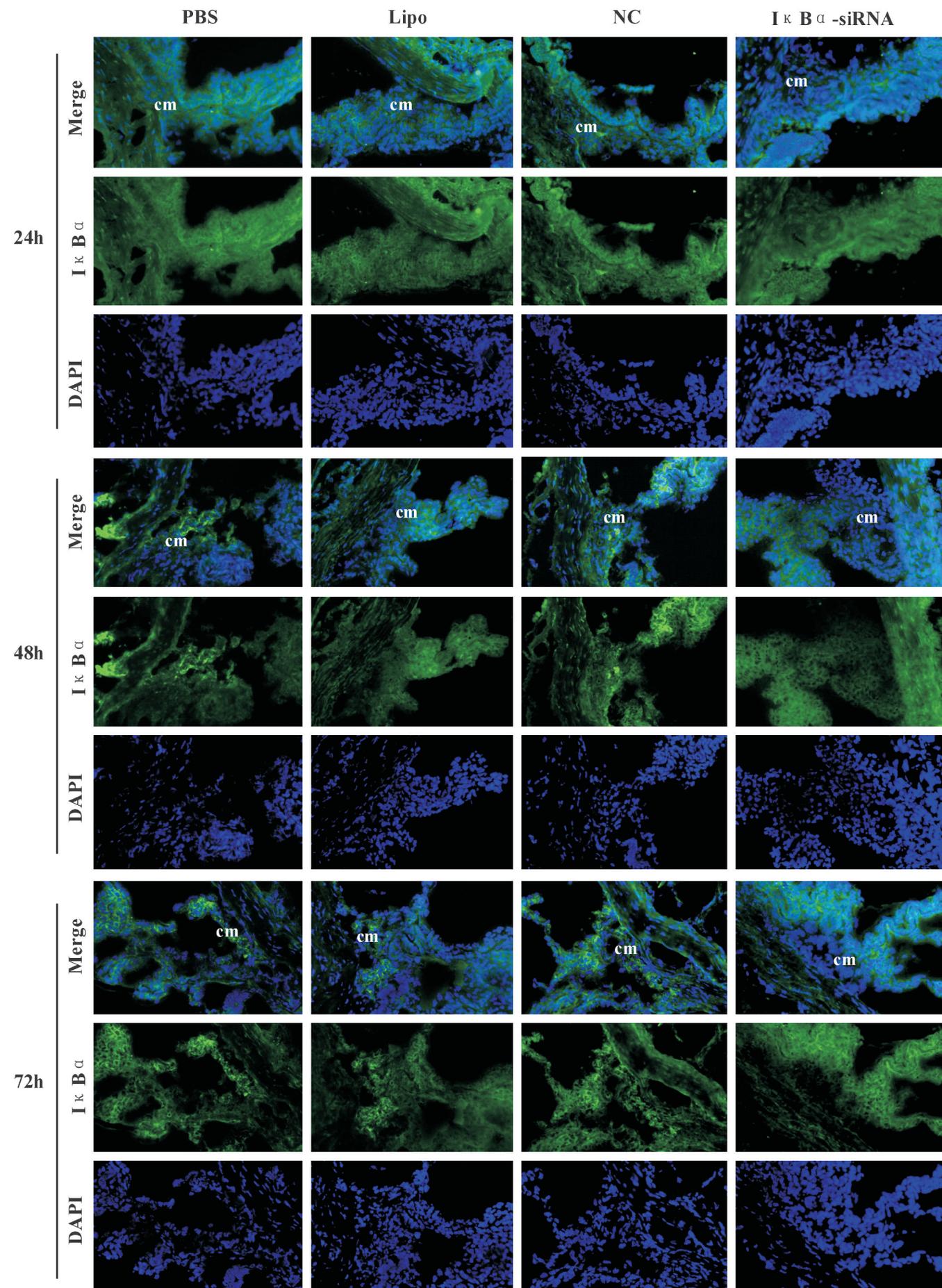


图6 免疫荧光检测前房注射 siRNA 后 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达 ( $\times 200$ ) cm; ciliary muscle 睫状肌; I $\kappa$ B $\alpha$  呈阳性为绿色荧光, 细胞核为蓝色荧光(DAPI 染色)。

广泛的非病毒基因载体,经典阳离子脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 具有转染效率高、对 siRNA 保护作用强、操作简单等特点,且一定浓度对组织细胞无毒性且无抗原性。本研究利用 Lipofectamine 2000 负载 siRNA,通过前房注射获得了较好的转染效果,前房注射 Cy3 标记 siRNA 与 Lipofectamine 2000 的复合物 24h 后,在大鼠睫状肌可观察到较多红色荧光聚集,少量见于小梁网,角膜内皮未见明显荧光分布。而 Liu 等<sup>[15]</sup>经小鼠前房注射后脂质体/siRNA 复合物主要分布于小梁网,可能与实验动物不同而房水动力学存在差异有关<sup>[16,17]</sup>。在葡萄膜巩膜房水流出途径中,前房与睫状肌间无上皮屏障,且睫状肌束间隙较宽,加之巩膜的纤维间隙具有淋巴管样作用,因此房水中的大分子物质可经此排出<sup>[18]</sup>。转染复合物经前房注射后可能是通过这一途径到达睫状肌而转染入细胞的。本研究中,前房注射脂质体及脂质体/siRNA 复合物后,均未观察到眼内炎及明显全身毒性,与相关研究结果一致<sup>[15]</sup>。

No. 3 I $\kappa$ B $\alpha$ /NC-siRNA 与 Lipofectamine 2000 的复合物转染至大鼠睫状肌后,通过 Real Time-PCR 及免疫荧光检测 I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达来验证其在体内的干扰效果。结果显示,在转染后 24, 48, 72h No. 3 I $\kappa$ B $\alpha$ -siRNA 注射组大鼠睫状肌 I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达量受到了明显抑制,其中, mRNA 水平在 24h 达最低,而蛋白水平在 72h 达最低。表明该 siRNA 序列是对大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$  基因进行 RNA 干扰的有效序列。

本实验成功筛选鉴定出 1 对能有效抑制大鼠睫状肌 I $\kappa$ B $\alpha$  基因的 siRNA 序列,为进一步在动物体内探究 I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 系统对青光眼葡萄膜巩膜房水流出通道的作用打下基础。

#### 参考文献

- 1 Weinreb RN, Toris CB, Gabelt BT, et al. Effects of prostaglandins on the aqueous humor outflow pathways. *Surv Ophthalmol* 2002;47 (Suppl 1): S53-64
- 2 Piotrowska A, Izykowska I, Podhorska-Okołów M, et al. The structure of NF- $\kappa$ B family proteins and their role in apoptosis. *Postepy Hig Med Dosw* 2008;62:64-74
- 3 Lan YQ, Zhang C, Xiao JH, et al. Suppression of IkappaBalpha increases the expression of matrix metalloproteinase-2 in human ciliary muscle cells. *Mol Vis* 2009;15:1977-1987

- 4 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 2001;25(4):402-408
- 5 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs to ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101(1):25-33
- 6 Behlke MA. Progress towards *in vivo* use of siRNAs. *Mol Ther* 2006;13(4):644-670
- 7 Husain S, Kaddour-Djebbar I, Abdel-Latif AA. Alterations in arachidonic acid release and phospholipase C-beta (1) expression in glaucomatous human ciliary muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1127-1134
- 8 金明,吴景天.体外培养猴眼小梁细胞及睫状肌细胞中组织金属蛋白酶抑制剂的表达. *中华眼科杂志* 2002;38(5):298-301
- 9 Zhong Y, Gao J, Ye W, et al. Effect of latanoprost acid and pilocarpine on cultured rabbit ciliary muscle cells. *Ophthalmic Res* 2007;39(4):232-240
- 10 Martinsen A, Schakman O, Yerna X, et al. Myosin light chain kinase controls voltage-dependent calcium channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch* 2013; [Epub ahead of print]
- 11 Poyer JF, Millar C, Kaufman PL. Prostaglandin F2 alpha effects on isolated rhesus monkey ciliary muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(12):2461-2465
- 12 Weinreb RN, Lindsey JD. Metalloproteinase gene transcription in human ciliary muscle cells with latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):716-722
- 13 Bloquel C, Bejjani R, Bigey P, et al. Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis. *FASEB J* 2006;20(2):389-391
- 14 Kowalczyk L, Boudinet M, El Sanharawi M, et al. *In vivo* gene transfer into the ocular ciliary muscle mediated by ultrasound and microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2011;37(11):1814-1827
- 15 Liu Q, Wu K, Qiu X, et al. siRNA silencing of gene expression in trabecular meshwork: RhoA siRNA reduces IOP in mice. *Curr Mol Med* 2012;12(8):1015-1027
- 16 Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(12):5168-5173
- 17 Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS, et al. Aqueous humor dynamics in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234(Suppl 1): S198-203
- 18 Bill A. The aqueous humor drainage mechanism in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) with evidence for unconventional routes. *Invest Ophthalmol* 1965;4(5):911-919