

# pEGFP-N1-Endostatin 重组质粒的构建及其体外表达

詹文芳 蔡善君 刘锐 谢兵 李红 宿昱

## Construction and transient protein expression of pEGFP-N1-Endostatin recombinant plasmids in vitro

Zhan Wenfang, Cai Shanjun, Liu Rui, Xie Bing, Li Hong, Su Gang. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

**Abstract Objective** Animal experiment and clinical trials have showed that endostatin (ES) can restrain intraocular neovessels by intraocular injection. The short half-life of ES and protein correct refolding and preparation process make it difficult to achieve the clinical long-term and high-dose drug requests. Present study was to construct the eukaryotic expression vector pEGFP-N1-Endostatin containing human ES gene in human embryo kidney (HEK-293) cells and detect its transient protein expression in vitro. **Methods** Recombinant plasmid pEGFP-N1-Endostatin was constructed by which cDNA sequence of ES used as template to gain ES gene fragment and synthesize the upper primer which contains the signal sequence by polymerase chain reaction and was inserted into eukaryotic expression vector pEGFP-N1. The vector was evaluated by Hind III and BamH I double enzyme incision, polymerase chain reaction and sequence analysis. Recombinant plasmid pEGFP-N1-Endostatin was transfected into HEK-293 cells by using cationic liposome, immunocytochemical staining, and Western blot was used to detect the transient expression of human ES protein in the supernatant of transfected cells in vitro. **Results** The inserted fragment was proved to be correct by Hind III and BamH I double enzyme incision, polymerase chain reaction and sequence analysis. The size of PCR amplified product of ES and recombined plasmid pEGFP-N1-Endostatin were consistent with the expected fragment. Compared with the sequence published in Genbank, the sequence of insert designation was coincident with human ES gene. The immunochemistry determined that transfected HEK-293 cells showed the brown-yellow staining in cytoplasm. Western blot results indicated that ES protein was expressed in HEK-293 cell supernatant with the relative molecular weight 20 000. **Conclusion** A eukaryotic expression vector of recombined plasmid pEGFP-N1-Endostatin is successfully constructed and human ES protein is effectively secreted in HEK-293 cells transfected ES gene.

**Key words** endostatin; eukaryotic expression vector; human embryo kidney cells; Western blot

**摘要 目的** 构建分泌型人内皮抑素(ES)的真核表达载体 pEGFP-N1-Endostatin 重组质粒, 鉴定其蛋白的体外瞬时表达。 **方法** 以 pcDNA3-Endo 质粒为模板, 通过 PCR 扩增获得人 ES 基因片段, 且在基因前加信号肽序列, 将其定向插入真核表达载体 pEGFP-N1 中, 获得重组质粒 pEGFP-N1-ES。采用 Hind III 和 BamH I 双酶切法、PCR 法及插入片段序列测定法鉴定该质粒。利用阳离子脂质体介导法, 将其转染到人胚胎肾 HEK-293 细胞中, 采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测转染细胞内及培养上清液中 ES 蛋白的表达。 **结果** 通过 Hind III 和 BamH I 双酶切、PCR 及测序鉴定证明构建出了含 ES 基因的真核表达载体, 且插入片段正确。采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测表明 HEK-293 细胞内及培养上清中存在相对分子质量为 20 000 的人 ES 蛋白表达。 **结论** 成功构建了重组质粒 pEGFP-N1-ES 真核表达载体, 转染 HEK-293 细胞后可稳定有效地分泌人 ES 蛋白。

**关键词** 内皮抑素; 真核表达载体; 人胚胎肾 HEK-293 细胞; Western blot

**分类号** R 773.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0864-06

本课题为贵州省科技厅自然科学基金资助(黔科合J字[2005]2061)

作者单位: 563003 遵义医学院附属医院眼科(詹文芳, 现在福建医科大学附属三明第一医院, 三明 365000)

通讯作者: 蔡善君 (Email: caishanjun@163.com)

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 等多种眼底疾病的病理基础,是导致患者视功能减退甚至致盲的主要原因,目前其发生机制仍不明确,但原发病均可活化视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞合成血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 导致 CNV 的发生<sup>[1]</sup>。通过抗 VEGF 治疗 CNV 已得到眼科界的普遍认同<sup>[2-3]</sup>。本研究以人非分泌型内皮抑素 (endostatin, ES) 质粒为模板,自行设计引物,克隆了人分泌型 ES 基因,并经测序证实序列正确,将其定向插入真核表达载体 pEGFP-N1 中,获得重组质粒 pEGFP-N1-ES,将其转染到人胚胎肾细胞 (human embryonic kidney cell, HEK-293) 中,可稳定有效地分泌人 ES 蛋白,为进一步研究 CNV 的基因治疗奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

T4DNA 连接酶、dNTPs (美国 New England Biolabs 公司); DNA Mark、Hind III 和 BamH I 内切酶、Taq DNA 聚合酶 (日本 Takara 公司), 高保真酶 platinum (美国 Invitrogen 公司); PCR 产物回收试剂盒 (美国 Promega 公司); 小量质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 氨苄青霉素、卡那霉素、链霉素 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶、DMEM 培养基 (德国 Sigma 公司); Lipofectamine 2000 (Lip2000) (美国 Invitrogen 公司); 无内毒素质粒大提试剂盒 (德国 Qiagen 公司); 羊抗人 ES (美国 R&D 公司); 鼠抗羊 IgG-HRP (武汉博士德公司); PVDF 膜 (美国 Milipore 公司); 菌种与质粒: DH5 $\alpha$  感受态细胞 (日本 Takara 公司), pcDNA3-Endo 质粒、克隆载体 pEGFP-N1 质粒 (多克隆位点上含有 Hind III 和 BamH I 酶切位点)、人胚胎肾 HEK-293 细胞 (四川大学华西医学院眼科分子生物学实验室提供); 其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 方 法

**1.2.1 真核表达载体 pEGFP-N1-Endostatin 的构建** 根据该基因序列设计引物,并在其 5' 端引入血清白蛋白信号肽序列, sEn-sin-Hind III -F 引物序列: 5'-GGCAAGCTTATGAAGTGGGTAACCTTTCTCCTCCTCCTTCA TCTCCGGTTCTGCCTTTTCTAGGGGTCACAGCCACCGC GACTTCCA-3', sEn-BamHI-600-R 信号肽序列: 5'-GGCGGATCCCTTGAGGCAGTCATGAAGCTGTT-3'。以 pcDNA3-Endo 为模板,利用上述引物进行 PCR 扩增,

PCR 反应总体积为 20  $\mu$ L。取 5  $\mu$ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 将 600 bp 片段回收,此片段即为带有血清白蛋白信号肽序列的人 ES 基因片段。pEGFP-N1-Endostatin 的构建:用 Hind III 和 BamH I 双切酶分别对回收的 EndoPCR 产物和 pEGFP-N1 进行双酶切 2 h,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,分别纯化回收 Endo 片段和 pEGFP-N1 载体片段,二者在 25  $^{\circ}$ C 下以 3:1 进行 3 h 连接反应,然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,对所获克隆扩大培养,提取质粒并鉴定。

**1.2.2 构建后表达质粒的鉴定** (1) Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定目的片段:将构建好的质粒命名为 pEGFP-N1-Endostatin。取质粒 5  $\mu$ L 稀释于含 Hind III 和 BamH I 各 0.3  $\mu$ L 缓冲液中,37  $^{\circ}$ C 水浴酶切过夜。酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD 凝胶成像系统下观察结果。(2) PCR 鉴定插入目的片段:引物 1: sEn-sin-Hind III -F (50  $\mu$ mol/L), 引物 2: sEn-BamHI-600-R (50  $\mu$ mol/L)。PCR 反应体积为 20  $\mu$ L, 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环后,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 5  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。(3) 测序鉴定目的片段:将经 PCR 和酶切鉴定正确的 pEGFP-N1-Endostatin 质粒送上海英俊生物技术公司测序鉴定,采用正向测序引物 CMV-F。测序结果与 PubMed 上公布的序列进行 Blast 比对,确定测序正确后,用大提试剂盒提取质粒用于转染。

### 1.2.3 pEGFP-N1-Endostatin 质粒转染 HEK-293 细胞

将液氮中保存的 HEK-293 细胞取出后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。分别在 6 孔板中每孔内接种  $2 \times 10^5$  个细胞,常规培养 48 h,此时细胞处于指数生长期,即可进行转染,具体步骤参照 Lip2000 说明书进行,实验中设阴性对照和 pEGFP-N1 空载体对照,转染 24 h 后,用 TE2000U 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司) 观察转染效率,72 h 后收集培养上清备用。

**1.2.4 HEK-293 细胞表达人 ES 蛋白的检测** SP 法免疫组织化学鉴定 HEK-293 细胞内 ES 的表达:以  $1 \times 10^5$  /mL 的细胞密度接种 1 mL 细胞悬液于预先置于有 24 mm  $\times$  24 mm 盖玻片的 6 孔板中,置于 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,制成细胞爬片,常规链亲合素法免疫细胞化学鉴定。

### 1.2.5 Western blot 法检测转染上清液中 ES 的表达

收集稳定转染的重组质粒细胞培养液和空质粒组及空白对照组细胞培养液上清,1 000 g 离心 10 min,收集



上清液样品蛋白,经 15% SDS-PAGE 上分离后湿转到 PVDF 膜上,以羊抗人 ES(美国 R&D 公司)为一抗,辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊 IgG-HRP 为二抗,进行蛋白质印迹分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增 ES 片段

对 PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳,PCR 扩增片段大小预期为 600 bp,可见实验结果与预期相符(图 1)。



图 1 ES 的 PCR 电泳

M: DL 2 000 (2 000、1 000、750、500、250、100 bp) 1: pcDNA3-Endo 为模板的 PCR 产物  
Fig. 1 PCR product of endostatin M: DL 2 000 (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp) Lane 1: PCR product used as template by means of pcDNA3-Endo

### 2.2 重组质粒 pEGFP-N1-Endostatin 的鉴定

#### 2.2.1 重组质粒 pEGFP-N1-Endostatin 的 PCR 鉴定

重组 pEGFP-N1-Endostatin 质粒经 PCR 后行 1% 琼脂

10	20	30	40	50	60
ATGAAGTGGG	TAACCTTTCT	CCTCCTCCTC	TTCATCTCCG	GTTCTGCCTT	TTCTAGGGGT
70	80	90	100	110	120
CACAGCCACC	GCGACTTCCA	GCCGGTGCTC	CACCTGGTTG	CGCTCAACAG	CCCCTGTCA
130	140	150	160	170	180
GCCGGCATGC	GGGGCATCCG	CGGGGCCGAC	TTCCAGTGCT	TCCAGCAGGC	GCGGGCCGTG
190	200	210	220	230	240
GGGCTGGCGG	GCACCTCCG	CGCCTCCTG	TCCTGGCGCC	TGCAGGACCT	GTACAGCATC
250	260	270	280	290	300
GTGGCCCGTG	CCGACCGCGC	AGCCGTGCC	ATCGTCAACC	TCAAGGACGA	GCTGCTGTTT
310	320	330	340	350	360
CCCAGCTGGG	AGGCTCTGTT	CTCAGGCTCT	GAGGTCCGC	TGAAGCCCGG	GGCACGCATC
370	380	390	400	410	420
TTTCCTTTG	ACGGCAAGG	CGTCTGAGG	CACCCACCT	GGCCCCAGAA	GAGCCTGTGG
430	440	450	460	470	480
CATGGCTCGG	ACCCCAACGG	GCGCAGGCTG	ACCGAGAGCT	ACTGTGAGAC	GTGGCCGACG
490	500	510	520	530	540
GAGGCTCCCT	CGGCCACGGG	CCAGGCCTCC	TCGCTGCTGG	GGGGCAGGCT	CCTGGGGCAG
550	560	570	580	590	600
AGTGCCGCGA	GCTGCCATCA	CGCCTACATC	GTGCTCTGCA	TTGAGAACAG	CTTCATGACT
609					
GCCTCCAAG					

糖凝胶电泳,可见 600 bp 条带,预期结果相同,PCR 鉴定正确(图 2)。



图 2 重组质粒 pEGFP-N1-Endostatin 的电泳图

M: DL 2 000 1: 以 pEGFP-N1-Endostatin 为模板的 PCR 产物 2: 以 pcDNA3-Endo 质粒为模板的 PCR 产物(阳性对照) 3: 阴性对照

Fig. 2 PCR product of pEGFP-N1-Endostatin Lane 1: PCR product used as template by means of pEGFP-N1-Endostatin Lane 2: PCR product used as template by means of pcDNA3-Endo Lane 3: negative control

#### 2.2.2 重组质粒 pEGFP-N1-Endostatin 的酶切鉴定

用 Hind III 和 BamH I 双酶切得到 4 700 bp 和 600 bp 2 条带,电泳结果与预期相符,该质粒经酶切鉴定正确(图 3)。

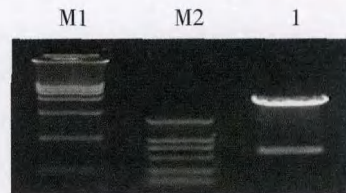


图 3 重组质粒 pEGFP-N1-Endostatin 的酶切电泳图

M1: DL 15 000 (15 000、10 000、7 500、5 000、2 500、1 000 bp) M2: DL 2 000 1: Hind III + BamHI

双酶切 pEGFP-N1-Endostatin 质粒得到 4 700 bp 和 600 bp 2 条带  
Fig. 3 Restriction mapping of pEGFP-N1-Endostatin recombinant plasmid M1: DL 15 000 (15 000 bp, 10 000 bp, 7 500 bp, 5 000 bp, 2 500 bp, 1 000 bp) M2: DL 2 000 Lane 1: two bands of 4 700 bp and 600 bp respectively



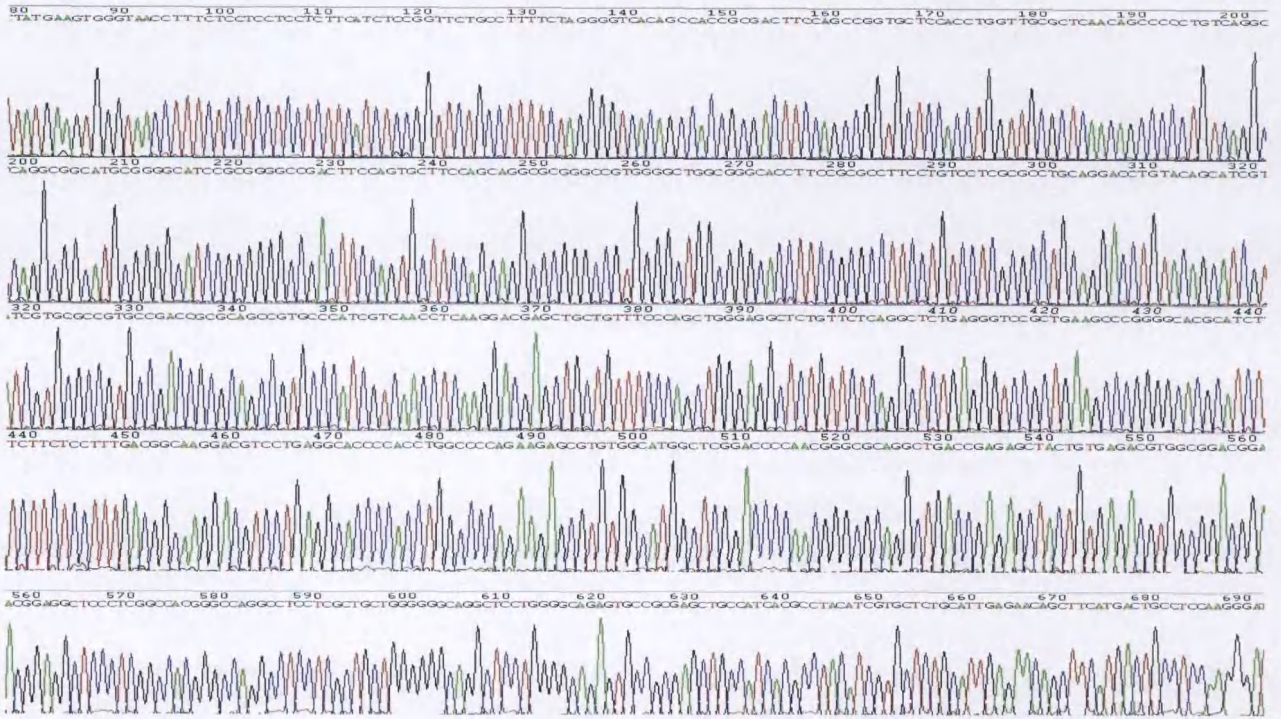


图 4 ES 基因测序结果

Fig. 4 Gene sequencing result of endostatin

2.2.3 ES 测序的鉴定 测序结果与 Genebank 中公布的序列进行 blast 比对,显示插入片段的序列与 hEndostatin 基因序列完全一致,插入方向和读码框架正确,获得的 pEGFP-N1-Endostatin 重组质粒构建正确(图4)。

2.3 pEGFP-N1-Endostatin 重组质粒转染 HEK-293 细胞

pEGFP-N1-Endostatin 重组质粒转染 HEK-293 细胞 48 h 后,在倒置荧光显微镜下可见 pEGFP-N1-Endostatin 重组质粒和对照组 pEGFP-N1 组细胞均有荧光,绿色荧光分布以胞核最为集中,提示 pEGFP-N1-Endostatin 重组质粒转染 HEK-293 细胞成功(图 5 ~ 7)。

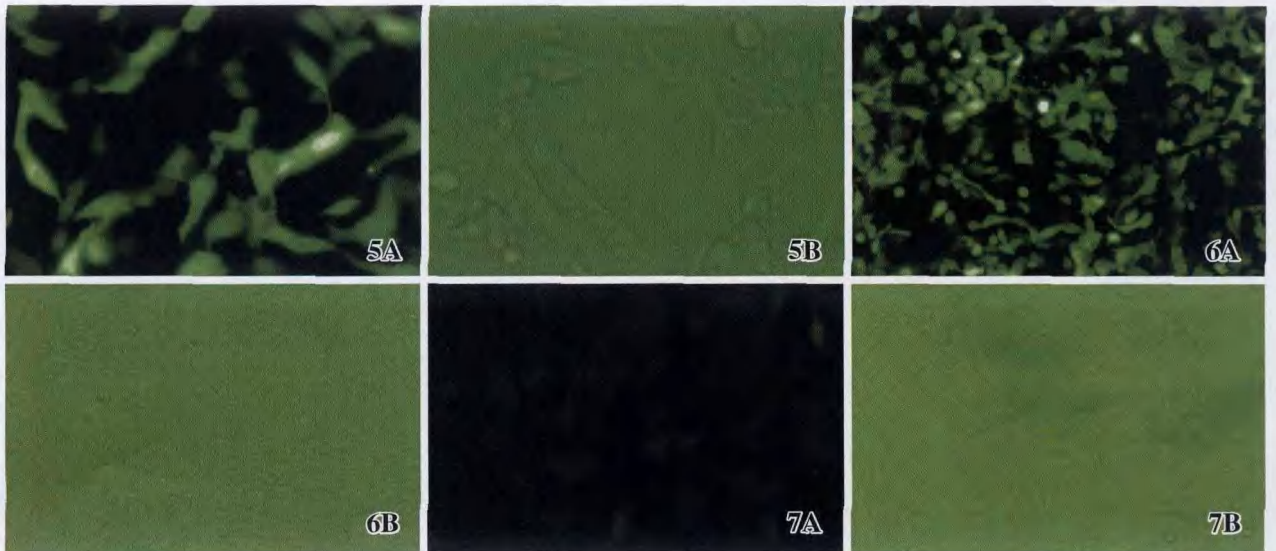


图 5 重组质粒转染 HEK-293 细胞 24 h 后 A: 荧光显微镜下结果(×200) B: 普通显微镜下结果(×200) 图 6 pEGFP-N1 质粒转染 HEK-293 细胞 24 h 后 A: 荧光显微镜下结果(×100) B: 普通显微镜下结果(×100) 图 7 空白对照组培养 HEK-293 细胞 24 h 后 A: 荧光显微镜下结果(×100) B: 普通显微镜下空白对照组结果(×100)

Fig. 5 The pEGFP-N1-Endostatin plasmid transfected HEK-293 cells for 24 hours A: the result under the fluorescence microscope (×200) B: the result under the general microscope (×200) Fig. 6 The pEGFP-N1 plasmid transfected HEK-293 cells for 24 hours A: the result under the fluorescence microscope (×100) B: the result under the general microscope (×100) Fig. 7 Cultivation of HEK-293 cells for 24 hours in blank control group A: the result under the fluorescence microscope (×100) B: the result under the general microscope (×100)



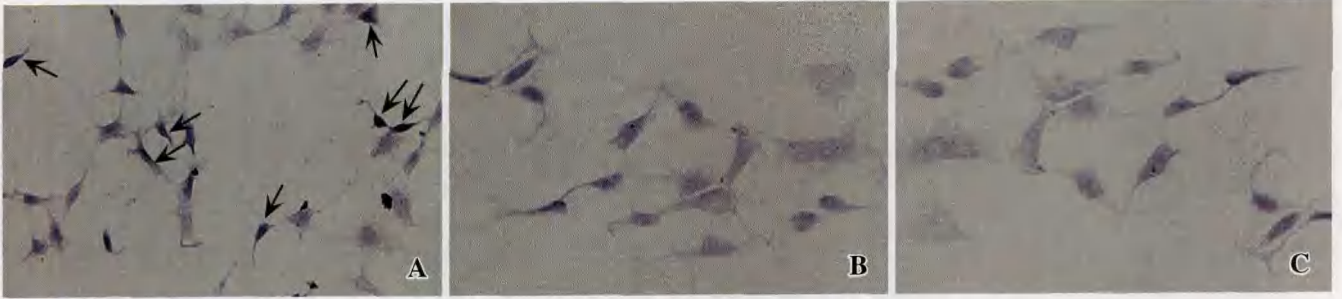


图 8 HEK-293 细胞免疫组织化学图(×400) A:hES/293 细胞 B:pEGFP-N1/293 细胞 C:HEK-293 细胞

Fig.8 Immunohistochemistry results of endostatin protein expressed by 293 cells(×400) A:human ES/293 cells B:pEGFP-N1/293 cells C:HEK-293 cells

### 2.4 重组质粒转染细胞后 ES 蛋白的表达

2.4.1 免疫组织化学鉴定 HEK-293 细胞内 ES 的表达 pEGFP-N1-Endostatin 转染 HEK-293 细胞后,部分 HEK-293 细胞浆内可见棕黄色的阳性反应,而空载体及对照组中细胞胞浆无染色(图 8)。

2.4.2 Western blot 法检测转染上清液中 ES 蛋白的表达 重组质粒组 HEK-293 细胞培养上清液在相对分子质量为 20 000 处出现单一蛋白条带,空质粒组及空白对照组无特异条带出现(图 9)。



图 9 HEK-293 细胞培养上清液中 ES 蛋白表达结果

Fig.9 Western blot results of endostatin protein expressed by 293 cell

### 3 讨论

CNV 在许多眼病的发生发展过程中起着重要的作用,CNV 伴随的出血、渗出和增生等病理改变,可以导致眼部的结构和功能破坏,造成患者严重的视功能损害。

长期以来,由于新生血管形成机制不明,至今尚无确切的药物治疗方法。目前新生血管的临床治疗有激光光凝、光动力疗法、经瞳孔温热疗法、手术剥离及放射治疗等,但复发率高、不可避免地损伤正常组织结构、加重或者诱发玻璃体视网膜增生、造成视功能进一步恶化等<sup>[4-7]</sup>,因此寻求抑制视网膜和 CNV 生成的药物疗法,是当前眼科学临床上急需解决的一个问题。近年来,抗 VEGF 的药物疗法<sup>[8-9]</sup>及生物治疗得到进一步的发展<sup>[10]</sup>,已知一些蛋白质因子可抑制新生血管

的生长,如 ES、血管抑素(angiotatin,AS)、色素上皮源性因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)<sup>[11]</sup>等。但由于视网膜和脉络膜是具有高度特异性的组织,常规的体内直接应用这些新生血管抑制剂治疗新生血管的疗效不佳<sup>[12]</sup>。直接采用重组蛋白作为治疗药物,在临床应用中亦存在许多缺点<sup>[13]</sup>:(1)重复注射。目前内源性因子的治疗一般采用静脉注射的方法,由于蛋白制剂的半衰期较短,新生血管性疾病的病程较长,需反复注射,长期治疗易造成相应的并发症。(2)治疗所需剂量较大<sup>[2]</sup>。(3)重组蛋白本身的毒性。目前的重组蛋白多来源于微生物制品,蛋白生成需要正确的重折叠,造价昂贵,目前制备的工艺提供临床长期、大剂量用药有一定困难;同时由于大剂量外源蛋白的注射,有可能引起免疫反应及感染。因此,将目的基因转入靶组织内使其持续分泌,达到有效浓度是一个较为理想的方法。

ES 由 O'reilly 等<sup>[14]</sup>从血管内皮瘤小鼠血清中分离出的内源性血管生成抑制因子,由胶原蛋白 X VIII 的 C-末端非胶原区内的 184 个氨基酸片段构成,相对分子质量为 20 000,能特异性抑制血管内皮细胞生长,而不影响其他非内皮系统起源的细胞。由于 ES 是胶原 X VIII 的 C 末端的一个相对分子质量为 20 000 的片段,本身无信号肽,需加一个外源性的信号肽才能成为分泌蛋白。它是一种强力内源性血管生成抑制因子,其靶细胞是血管内皮细胞,需要在表达后分泌至细胞外而发挥其抗血管生成活性。这就要求在 ES 蛋白的 N 末端连接一个分泌信号肽,介导分泌蛋白到达细胞外,而不影响分泌蛋白的活性。因此,所选信号肽能否发挥作用是本实验成功与否的关键。国内外进行真核表达所采用的分泌信号大致有以下几种情况<sup>[15-16]</sup>:与蛋白同源的分泌信号;与宿主表达细胞同源的分泌信号;机体内高效表达分泌蛋白的分泌信号,如血清白蛋白和 IgG 的分泌信号<sup>[17]</sup>,本实验采用血清清蛋白作为分泌信号。如何将分泌信号的 DNA 序列与非分泌型 ES

连接是问题的关键,本实验采用传统的拼接方法,即采用引入限制性内切酶位点 Hind III 和 BamH I 来拼接,合成含信号肽的加长肽链(86 bp)作为上游引物,用 PCR 的方法构建人分泌型 ES 质粒,所获 609 bp 的 ES 基因片段,经与 GenBank 中人胶原 XVIII cDNA 和 ES 基因比较,基因序列完全一致。

ES 是一种内源性细胞因子,转染细胞后应表达并分泌蛋白,为了验证是否有蛋白的表达和分泌,本研究采用 ES 质粒转染 HEK-293 细胞,采用 SP 法检测细胞内的 ES 蛋白表达,结果显示 HEK-293 细胞浆内可见棕黄色的阳性反应;Western blot 检测显示转染 pEGFP-N1-Endostatin 后,HEK-293 细胞培养上清液中出现相对分子质量为 20 000 的单一蛋白条带,空载体组及空白对照组无特异条带出现。

## 参考文献

- Lebherz C, Albert M, Maguire AM, et al. Nonhuman primate models for diabetic ocular neovascularization using AAV2-mediated overexpression of vascular endothelial growth factor [J]. *Diabetes*, 2005, 54(4): 1141 - 1149
- 尚庆丽, 马景学, 魏敬双, 等. 内皮抑素抑制脉络膜新生血管的实验研究[J]. *中华眼科杂志*, 2004, 40(4): 266 - 271
- Balagan KS, Binley K, Esapa M, et al. EIAV vector delivery of angiostatin or endostatin inhibits angiogenesis and vascular hyperpermeability in experimental CNV [J]. *Gene Therap*, 2006, 13(15): 1153 - 1165
- 孙悦, 王玲. 经瞳孔温热疗法治疗年龄相关性黄斑变性[J]. *眼科研究*, 2007, 25(4): 317 - 320
- Gustavsson C, Agardh E. Transpupillary thermotherapy for occult subfoveal choroidal neovascularization: a 1-year, prospective randomized pilot study [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2005, 83(2): 148 - 153
- 张美霞, 陆方, 严密, 等. 光动力疗法治疗渗出型老年性黄斑变性四年临床观察总结[J]. *中华眼底病杂志*, 2004, 20(5): 275 - 279
- Miskala PH, Bass EB, Bressler NM, et al. Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: quality-of-life findings: SST report no 11 [J]. *Ophthalmology*, 2004, 111(11): 1967 - 1980
- 齐慧君, 黎晓新, 尹虹, 等. 玻璃体腔注射 bevacizumab 治疗特发性脉络膜新生血管膜的临床观察[J]. *眼科研究*, 2009, 27(6): 494 - 498
- Ciulla TA, Rosenfeld PJ. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for neovascular ocular diseases other than age-related macular degeneration [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2009, 20(3): 166 - 174
- Pechan P, Rubin H, Lukason M, et al. Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization [J]. *Gene Ther*, 2009, 16(1): 10 - 16
- 刘彦, 李俊荣. 色素上皮细胞衍生因子基因治疗视网膜及脉络膜新生血管性疾病研究进展[J]. *眼科研究*, 2006, 24(3): 330 - 333
- The Pharmacologic Treatment for Macular Degeneration Study Group. Interferon alpha-2a is ineffective for patients with choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Results of a prospective randomized placebo controlled clinical trial [J]. *Arch Ophthalmol*, 1997, 115(7): 865 - 872
- Nguyen QD, Shas S, Tatlipinar S, et al. Bevacizumab suppresses choroidal neovascularization caused by pathological myopia [J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89(10): 1368 - 1370
- O'reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: A endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277 - 285
- Ambs S, Dennis S, Fairman J, et al. Inhibition of tumor growth correlates with the expression level of a human angiostatin transgene in transfected B16F10 melanoma cells [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(11): 5773 - 5777
- Chen QR, Kumari D, Stass SA, et al. Liposomes complex to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(7): 3308 - 3312
- 付洛安, 章翔, 吴景文, 等. Endostatin 基因真核表达载体的构建及活性鉴定 [J]. *第四军医大学学报*, 2001, 22(23): 2162 - 2165

(收稿:2008-12-24 修回:2009-09-05)

(本文编辑:王莉红)

消息

## 《结膜松弛症手术治疗》视频资料(DVD)介绍

结膜松弛症是常见的年龄相关性眼表疾病。随着人口老龄化的加快,结膜松弛症患者人群日趋增多。严重的结膜松弛症需要手术治疗,为了规范手术治疗方案,杜绝医源性的眼表损伤,张兴儒教授将 10 余年对此病手术治疗的研究成果:手术治疗适应证,手术规范操作,手术并发症的预防及处理等关键技术,结合文献资料,制成光盘。经陈家祺教授、褚仁远教授、谢立信院士、刘祖国教授、姚克教授等国内权威专家审核,被列为国家“十一五”重点音像出版物规划项目 150 号,由中华医学电子音像出版社编辑制作成《结膜松弛症手术治疗》视频资料(DVD)出版发行。

本手术光盘对结膜松弛症手术治疗的四种方法进行系统演示,从手术适应证、手术方法、术后处理到手术并发症都进行操作描述。手术过程完整、精彩、技术娴熟,是我国第一部结膜松弛症手术操作视频资料(DVD),对提高我国结膜松弛症的手术质量将起到积极的作用,值得眼科医师学习与借鉴。

《结膜松弛症手术治疗》视频资料(DVD)定价 60 元,可与中华医学电子音像出版社(北京东四西大街 42 号,电话:010-85158538)联系购买;也可直接邮局汇款到(邮编:200062,上海市兰溪路 164 号,上海中医药大学附属普陀医院眼科,李青松医师收)购买,款到后立即免费邮寄,咨询电话:021-62572723 转 8021 可找眼科李青松、项敏泓、周欢明、张桂明等。

(李青松)