

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2007 )15-1349-03

## RNA 体外干扰肝癌 Hep-3B 细胞 VEGF 基因的表达

蒋冬贵<sup>1</sup> 夏 昆<sup>1</sup> 刘 劫<sup>3</sup> 罗 红<sup>2</sup> 潘 乾<sup>1</sup> 龙志高<sup>1</sup> 夏家辉<sup>1</sup>( 中南大学<sup>1</sup> 国家重点遗传实验室<sup>2</sup> 湘雅二医院 湖南 长沙 410008<sup>3</sup> 南华大学 湖南 衡阳 421001 )RNA interferes the expression of VEGF gene in hepatocarcinoma Hep-3B cells *in vitro*JIANG Dong-Gui<sup>1</sup>, XIA Kun<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>3</sup>, LUO Hong<sup>2</sup>, PAN Qian<sup>1</sup>, LONG Zhi-Gao<sup>1</sup>, XIA Jia-Hui<sup>1</sup><sup>1</sup>National Laboratory of Medical Genetics, Second Affiliated Hospital, Xiangya Medical College, Changsha 410078, China,<sup>3</sup>Nanhua University, Hengyang 421001, China【Abstract】AIM: To construct RNAi plasmids and synthesize siRNA *in vitro*, transport them into Hep-3B cells, so as to find some effective VEGF RNAi plasmids and siRNA segments.METHODS: The RNAi plasmids pcDUVEGF-1, pcDUVEGF-2 and siRNA segments TWveg-1, TWveg-2 were transported into Hep-3B cells, and the expressions of VEGF mRNA and protein in the transfected Hep-3B cells were checked using RT-PCR, Western Blot and ELISA. The results were compared between the transfected and the normal Hep-3B cells. RESULTS: There were prominent differences between the two groups in depressing the expression of mRNA ( 0.28, 0.47, 0.76, 0.58 vs 1.2,  $P < 0.01$  ) and protein ( 138, 121, 249, 227 vs 389  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$  ) of VEGF gene. CONCLUSION: The two RNAi plasmids and siRNA segments inhibit the expression of VEGF gene effectively.

【Keywords】RNAi; siRNA; VEGF; hepatocarcinoma

【摘要】目的: 通过自主构建的 RNAi 载体和体外合成 siRNA 的方法, 寻找能有效干扰 VEGF 基因表达的载体和 siRNA 片段治疗肿瘤. 方法: 将自主构建的 pcDUVEGF-1 和 pcDUVEGF-2, 以及体外合成的 TWveg-1 和 TWveg-2 siRNA 片段转染肝癌 Hep-3B 细胞, 通过 RT-PCR, Western Blot 和 ELISA 检测转染前后 VEGF 的 mRNA 及蛋白表达水平, 以了解 RNA 干扰效果. 结果: 两种 RNA 干扰的方法均能抑制 VEGF 基因的表达且差异具有显著性( mRNA 0.28, 0.47, 0.76, 0.58 vs 1.2,  $P < 0.01$ ; 蛋白质, 138, 121, 249, 227 vs389  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$  ). 结论: 两个质粒及 siRNA 片段均能有效的抑制 VEGF 基因的表达.

【关键词】RNAi; siRNA; 血管内皮生长因子; 肝癌细胞

【中图分类号】R318 【文献标识码】A

## 0 引言

VEGF/VEGFR 系统在恶性肿瘤中的协同表达, 旁/自分泌作用机制的确立为肿瘤的临床治疗提供了新的靶点. 在哺乳动物的细胞种发夹结构的双链 RNA 被剪切成 siRNA, 在体内组装成蛋白复合体, 在 siRNA 的引导下 Dicer 酶切割靶 RNA, 或者以靶 RNA 为模板合成新的双链 RNA, 进一步被 Dicer 识别和剪切. 21nt siRNA 在哺乳动物细胞中可以诱导强有力的特异性 RNAi 作用<sup>[1-4]</sup>. 我们使用自主构建的 RNAi 真核基因表达载体 pcDU6 选择特异的 VEGF 基因片段构建 VEGF 基因的 RNAi 质粒, 选择特异的 VEGF 基因片段体外合成 21nt siRNA, 并将它们脂转入肝癌 Hep-3B 细胞后, 通过 RT-PCR, Western Blot 和 ELISA 的方法检测它们对 VEGF mRNA 和蛋白表达的抑制作用, 以期找到可靠的抑制 VEGF 基因表达的质粒和 siRNA 片段, 为肝癌的基因治疗提供一种新的方法.

## 1 材料和方法

1.1 材料 设计合成两段人 U6 promoter-315 至 +1 的 PCR 寡核苷酸引物从人的 gDNA 中扩增出 U6 promoter( 5'端增加 Bgl II 3'增加 Apa I 的酶切位点). 将 PCR 产物用 Bgl II 和 Apa I 双酶切后, 再将 pcDNA 3.1(-)质粒用 Bgl II 和 Apa I 双酶切, 构建成 RNAi 质粒 pcDU6, 构建 pcDU6 的引物序列为 正向: 5' gcagatctacgcgcaggcaaaacgcacc, 反向: 5' ttggcccgggtttctgtccttccac. 根据高效 RNAi 基因片段的设计原则<sup>[2]</sup> 我们设计并从上海博亚生物制品有限公司申请合成了构建 VEGF 基因 RNAi 载体的寡核苷酸片段以及体外合成针对 VEGF 基因的 siRNA 的寡核苷酸片段. 肝癌 Hep-3B 细胞株购自 CCTCC, 非必需氨基酸( NAA ), 丙酮酸钠, 胎牛血清、胰酶、EDTA, G418 均购自 Gibco 公司, RPMI 1640 干粉培养基购自 Hyclone 公司, 脂质体 2000 Invitrogen 公司. T7 Ri-

收稿日期: 2007-03-08; 接受日期: 2007-03-30

基金项目: 医学遗传学国家重点实验室主任基金( 200204 ); 中南大学研究生创新课题基金( 20010137 )

通讯作者: 夏 昆. Tel ( 0731 ) 4805359 Email xiangy@xysm.net

作者简介: 蒋冬贵. 博士生( 导师夏家辉 ), 主治医师. Tel ( 0731 ) 4497974 Email jiangdonggui@163.com

boMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega 公司); Klenow Fragment (Takara 公司); DEPC (Sigma 公司). Trizol Reagent (Gibco BRL) 174 Hinc digest DNA Marker, Taq 酶宝生物工程有限公司; AMV 逆转录试剂盒 (Promega 公司); 蛋白质 Marker (上海生化试剂公司); X-film (上海爱克发感光器材有限公司); VEGF ELISA 检测试剂盒 (Diagnostics Systems 公司); 兔抗人 VEGF 多抗 (NEOMARKERS 公司); 山羊抗兔二抗 (PKD 公司).

**1.2 方法** 实验组为 pcDUVEGF-1, pcDUVEGF-2 阳性克隆和转染 Tveg-1, Tveg-2 siRNA 的 Hep-3B 细胞, 对照组为常规培养的 Hep-3B 细胞. 用 *Apa* I 和 *Bam*H I 双酶切 pcDU6 质粒, 分别取 RVEGF-1, RVEGF-2 的 Reverse, Forward, 将酶切产物与双链的 RVEGF-1 做连接, 连接产物转化 JM109, 挑取阳性克隆并测序证实后扩增质粒. 将连接上 RVEGF-1 的质粒取 1  $\mu$ L 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 将 RVEGF-2 连接到带有 RVEGF-1 的质粒上并测序证实, 命名为 pcDUVEGF-1. 将 RVEGF-3 和 RVEGF-4 连接 pcDU6 质粒上并测序证实, 命名为 pcDUVEGF-2. 将 T7 promoter 分别与 TWveg-1, TWveg-2, TWveg-3, TWveg-4 (均为 1g/L) 退火, 用 Klenow Fragment 补平. 用 T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System 试剂盒体外合成双链的 R-DNA, 按 TWveg-1 与 TWveg-2 混合, TWveg-3 与 TWveg-4 混合, 分别往上述 R-DNA 混合液中加入 Rnase-Free-DNase 1  $\mu$ L 于 37°C 温浴 15 min 后立即于 95°C 灭活酶活性 5 min, 常温下冷却, Qiagen 小寡核苷酸纯化柱纯化. 所得产物分别命名为 Tveg-1, Tveg-2, 电泳跑 2.0 胶检测证实, -20°C 保存待用. 按质粒、寡核苷酸 (dNTP 与 siRNA 的混合物) 与脂质体的比例为 1  $\mu$ g:2  $\mu$ L 混匀 5 min, 溶于不含血清的 RPMI 1640 液中, 室温 30 min 后转染 Hep-3B 细胞. siRNA 转染 Hep-3B 细胞 24 h 后换无血清培养 24 h, 取上清行 Western Blot, ELISA 检测, 抽总 RNA 行 RT-PCR 检测.

**1.2.1 VEGF mRNA 表达的检测** Hep-3B 细胞用有血清的 RPMI1640 培养基重悬. 当 T25 培养瓶细胞汇合率达到 90% ~ 95% 时换液, PBS 洗涤, 各取 20  $\mu$ L 脂质体和 20  $\mu$ g pEGFP-N1 (用以了解脂转效率), pcDUVEGF-1 和 pcDUVEGF-2 质粒混匀 5 min 后加无血清 RPMI 1640 培养基 800  $\mu$ L 混匀后加入到上述 T25 瓶培养的 Hep-3B 细胞上, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37°C 温箱培养 24 h 后加 G418 (800 mg/L) 筛选. 将阳性克隆加有血清 RPMI 1640 培养基重悬并转移到 6 孔板中培养. 用 Trizol 抽实验组和对照组细胞的总 RNA,

同时用一对  $\beta$ -actin 引物做对照, 做半定量 RT-PCR. 经电泳图像分析扫描得到 VEGF 与 actin 条带峰面积积分比值作为计算 VEGF PCR 产物相对定量, 比较实验组和对照组 VEGF mRNA 的表达丰度.

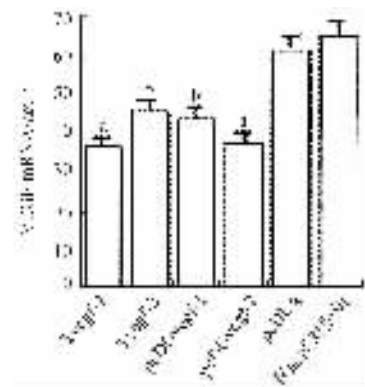
**1.2.2 VEGF 蛋白的检测** 将实验组和对照组的变异性上清跑 100 g/L 的 PAGE 胶, 用 Marker 及阴阳性对照, 行 Western Blot 检测. 另将实验组每种质粒、siRNA 和对照组均设 4 孔 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37°C 培养 24 h 后, 换无血清 RPMI 1640 培养基培养 24 h, 取上清冻存于 -20°C. 用 VEGF ELISA 检测试剂盒的检测实验组和对照组的 Hep-3B 细胞分泌的 VEGF 的量.

**1.2.3 Hep-3B 细胞生长曲线的测定** 将筛选出的 RNAi 阳性克隆细胞 (包括空载体 pcDU6) 和转染 siRNA (转染 24 h 后) 接种于 96 孔培养板中, 设空白对照 (不含细胞的 PBS) 进行 MTT 法测细胞的活力. 测定 570 nm 处的吸光度 A 值, A 值的大小反映 Hep-3B 细胞成活数量及活性. 以时间为横坐标 (d), 减去空白对照的吸光度 A 值为纵坐标绘制生长曲线图.

统计学处理 SPSS10.0 软件进行 *t* 检验和 *F* 检验.

## 2 结果

**2.1 RNAi 质粒和 siRNA 对 VEGF mRNA 表达的影响** 构建好的 pcDUVEGF-1 和 pcDUVEGF-2 质粒, 体外合成的 Tveg-1 和 Tveg-2 siRNA.  $\beta$ -actin 为内参照, 按 100 ng/mL 培养基的 Tveg-1, Tveg-2 作用于 Hep-3B 细胞后 RT-PCR 扩增扫描 Tveg-1 组、VEGF-2 组与无血清对照组比较 VEGF mRNA 表达水平明显降低, pcDUVEGF-1 组、pcDUVEGF-2 组与无血清对照组比较 VEGF mRNA 表达水平明显降低. 而 pcDUVEGF-1 组、pcDUVEGF-2 组、pcDU6 组与无血清对照组比较 VEGF mRNA 表达水平无明显差别, 有血清对照组与无血清对照组比较 VEGF mRNA 表达水平无明显差别 (图 1).



\**P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 对照组.

图 1 VEGF mRNA 与 actin 比值变化

**2.2 VEGF 蛋白质检测** 将实验组中 pcDUVEGF-1 组、pcDUVEGF-2 组、Tvegf-1 组和 Tvegf-2 组与对照组即无血清培养组及 PRMPI 1640 培养基行 Western Blot 检测,发现实验组的 VEGF 相对蛋白浓度 (VEGF/actin) 高于对照组 (0.28  $\rho$ . 47  $\rho$ . 76  $\rho$ . 58 vs 1.2,  $P < 0.01$ ). 将实验组和对照组的 Hep-3B 的上清进行 ELISA 检测发现,实验组各组的 VEGF 蛋白质浓度均明显低于对照组 (138, 121, 249, 227 vs 389  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ), Tvegf-1 组与 Tvegf-2 组比较无明显差异 ( $P > 0.05$ ), pcDUVEGF-2 组明显低于 pcDUVEGF-1 组 ( $P < 0.01$ ).

**2.3 Hep-3B 细胞生长曲线** TWvegf-1 和 pcDUvegf-2 二组细胞生长均明显受到抑制 ( $P < 0.01$ ), TWvegf-2 和 pcDUvegf-1 二组细胞生长均明显受到抑制 ( $P < 0.05$ , 图 2).

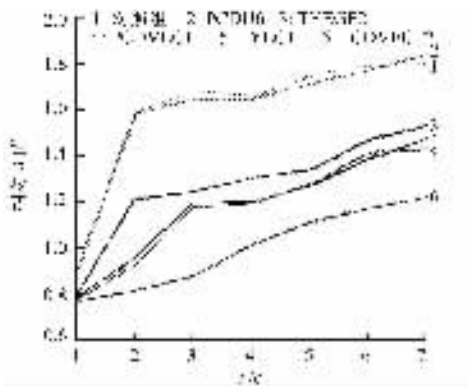


图 2 Hep-3B 细胞生长曲线

### 3 讨论

原发性肝癌(HCC)是典型的富血供恶性肿瘤. 肿瘤血管生成是 HCC 生长和转移的先决条件. 预先存在的血管发芽形成新血管包括释放血管新生因子、激活基质金属蛋白酶、降解细胞外基质及尔后的重塑细胞外基质等步骤<sup>[5]</sup>. 对 HCC 肿瘤血管生成分子机制的研究表明,血管内皮细胞生长因子(VEGF)是目前已知在 HCC 肿瘤血管生成中作用最强的血管生成诱导因子. 因此我们选择了 VEGF 基因作为 RNAi 肝

癌基因治疗和肝癌与 VEGF 关系的研究的出发点. 按照选择高效的 RNAi 基因治疗的片段的原则,分别选择了 2 段针对 VEGF 基因的 DNA 片段用于构建 VEGF 基因的 RNAi 载体,2 段针对 VEGF 基因的 DNA 片段用于体外合成 siRNA 片段,并分别将它们用脂质体转染 Hep-3B 细胞,通过半定量 RT-PCR, Western Blot 和 ELISA 检测 VEGF 基因的表达发现,这 4 个片段均能有效但(不完全)抑制 VEGF 基因的表达,且不同位置的 RNA 干扰效果存在明显的差别. 细胞抑制实验也得到了同样的结果. 这表明这些片段可以用于抑制肝癌细胞表达 VEGF 蛋白,从而抑制肝癌肿块的血管生长和肝癌细胞的增生和转移,达到基因治疗肝癌的目的.

实验结果表明我们设计的针对 VEGF 基因的 RNAi 载体和体外合成的 siRNA 能有效的抑制 VEGF 基因的表达,但是在实验的过程中我们发现,将载体和 siRNA 脂质体转染 Hep-3B 细胞的效率低(约 10%)且 Hep-3B 细胞对裸鼠的致瘤率也低,这是阻碍将本实验方法用于动物实验的主要困难,如何改善转染效率是很重要的研究方面. 当 VEGF 基因被有效抑制后,肝癌细胞的生长和凋亡是否受到影响和受影响的程度是我们进一步的研究课题.

### 【参考文献】

- [1] Whither RNAi [J]. Nat Cell Biol 2003, 5: 489-492.
- [2] Doi N, Zenno S, Ueda R, et al. Short interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors [J]. Curr Biol 2003, 13: 41-47.
- [3] Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99: 1443-1448.
- [4] Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 46-52.
- [5] Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Oncogene 2000, 19(49): 5598-5605.

编辑 许昌泰