

[文章编号] 1000-4718(2008)02-0242-04

RNAi 沉默 *Cripto* 基因对结肠癌细胞 血管内皮生长因子的抑制*

范钰¹, 张尤历¹, 李华², 许则丰³, 郑树^{3△}

(¹ 江苏大学附属医院消化科, 江苏 镇江 212001; ² Department of Pharmacology and Toxicology, Dartmouth Medical School, Dartmouth College, Hanover, NH 03755, USA; ³ 浙江大学肿瘤研究所, 浙江 杭州 310009)

[摘要] 目的: 研究 *Cripto* 基因对结肠癌细胞血管内皮生长因子的影响。方法: 设计合成针对 *Cripto* 基因的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 转染结肠癌 LS-174T 细胞。细胞分 4 组: 空载对照组 (对照组) 和不同浓度 (3.125、6.25 和 12.5 nmol/L) 的 siRNA 组。分别于转染 24、48、72 h 后收集细胞, 以实时定量 PCR 检测结肠癌细胞 *Cripto* mRNA, 分别采用 Northern blotting 和免疫荧光标记法检测癌细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达。分别收集转染 72 h 的 12.5 nmol/L 组和对照组细胞, 接种于裸鼠背部。30 d 后处死裸鼠, 收集裸鼠肿瘤组织, 对组织 VEGF 进行免疫组化染色, 计算染色平均强度。结果: 实时定量 PCR 检测显示, 转染组 *Cripto* mRNA 被有效地抑制, 且呈浓度和时间依赖性。转染组细胞 VEGF 蛋白和 mRNA 明显低于对照组。裸鼠肿瘤免疫组化分析显示, 转染组 VEGF 平均染色强度明显低于对照组。结论: *Cripto* 基因参与了结肠癌组织血管生成的调控。采用 siRNA 下调 *Cripto* 基因表达, 可抑制结肠癌组织血管生成。

[关键词] 结肠肿瘤; 基因, *Cripto*; RNA 干扰; siRNA; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of inhibition of *Cripto* gene siRNA on vascular endothelial growth factor of colon cancer cell line LS-174T

FAN Yu¹, ZHANG You-li¹, LI Hua², XU Ze-feng³, ZHENG Shu³

(¹ Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China; ² Department of Pharmacology and Toxicology, Dartmouth Medical School, Dartmouth College, Hanover, NH 03755, USA; ³ Cancer Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China. E-mail: zhengshu@zju.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effects of *Cripto* gene on vascular endothelial growth factor (VEGF) of colon carcinoma cells. **METHODS:** *Cripto* siRNA was designed and constructed. Colon cancer LS-174T cells were divided into 4 groups: control group and different dose (3.125, 6.25 and 12.5 nmol/L) of siRNA groups. After transfected for 24, 48 and 72 h, colon cancer cells were harvested to carry on the next tests. Expression of *Cripto* mRNA was determined with real-time PCR, and immunofluorescence isothiocyanate (FITC) labeling assay and Northern blotting were performed to examine the expression of protein and mRNA of VEGF, respectively. The cells in control group and cells transfected with 12.5 nmol/L siRNA were inoculated into nude mice respectively. 30 days after inoculated, the mice of two groups were executed, and immunohistochemical (ICH) assay was used to evaluate the VEGF protein of mice tumor. **RESULTS:** siRNA down-regulated the *Cripto* mRNA in a dose and time dependent manner. Protein and mRNA of VEGF in transfected cells reduced in a dose and time dependent manner. Compared to control, the expression of VEGF protein from ICH assay was lowered significantly ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** *Cripto* gene might contribute to the regulation of angiogenesis of colon carcinoma. The down-regulation of *Cripto* gene by siRNA can suppress angiogenesis of human colon cancer.

[KEY WORDS] Colonic neoplasms; Genes, *Cripto*; RNA interference; siRNA; Vascular endothelial growth factors

肿瘤血管生长是肿瘤生长和转移的基础。血管 VEGF) 是 1 个强有力的促血管生成因子, 在与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, 内皮细胞增生相关的生理和病理过程中起重要作用

[收稿日期] 2006-09-06 [修回日期] 2007-01-19

* [基金项目] 中国博士后基金项目 (No. 2003033547); 镇江市科技计划项目 (No. SH2006019)

△通讯作者 E-mail: zhengshu@zju.edu.cn

用,特别是与实体瘤的关系密切。结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,发现时大多数已有转移。有报道,大肠癌细胞中 VEGF 表达增加^[1]。Widel 等^[2]检测结肠癌新鲜标本,发现在有淋巴结转移的肿瘤中 VEGF 显著增高。说明新生血管的形成在大肠癌生长、转移中具有重要作用。*Cripto* 基因与许多恶性肿瘤的发生发展密切相关^[3-6]。*Cripto* 基因最早在人和小鼠胚胎肿瘤细胞中发现其表达,进而发现在人乳腺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、阴茎癌、膀胱癌及前列腺癌中均呈过度表达,而它在正常组织中都不表达或低表达。前期研究发现,针对 *Cripto* 基因的反义寡核苷酸转染结肠癌 LS-174T 细胞抑制癌细胞恶性增殖和端粒酶活性^[7]。提示 *Cripto* 基因在结肠黏膜癌变过程中起重要的作用。但目前尚不清楚 *Cripto* 基因在结肠癌细胞血管形成中的可能作用。本研究采用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术,设计合成 *Cripto* 基因的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 研究其对结肠癌细胞 VEGF 表达的影响。

材 料 和 方 法

1 材料

人结肠癌 LS-174T 细胞,购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所。根据 *Cripto* 基因序列特点设计 siRNA, siRNA 正义链为 5' - UUCGGC-CUCGGUCUCCCCATT - 3'; 针对靶点区域:175 - 195 (该基因 siRNA 专利号 D290604)。本 siRNA 由 Dharmacon 公司化学合成,采用毛细管凝胶电泳法来鉴定合成 siRNA 纯度。该 siRNA 经过 2 位上脱保护、脱盐、纯化和退火形成双链处理,然后溶于焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的蒸馏水中。实时定量 PCR *Cripto* 引物:上游 5' - CAATTCGGCCTCGGTCTTC - 3'; 下游 5' - TTCAGGCAGCAGGTTCTGTTF - 3'。FAM 探针引物 5' - CTCCTTACTGTGCTGTATC-CCCATGG - 3'。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (GAPDH) 为内参。转染试剂 oligofectamine、Trizol 及逆转录酶 SSRT II 购自 Invitrogen 公司。BALB/c 裸鼠 15 只,雌性,4 周龄,体重约 14 - 18 g,购自中国科学院上海生物化学研究所,于无特殊病原体条件 (SPF) 下饲养。免疫组化所用第 I 抗体 VEGF 单抗和生物素连接的 IgG,购自 Dako 公司。

2 细胞培养和转染

结肠癌 LS-174T 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,37 °C、5% CO₂、饱和湿度环境

的条件下连续培养。转染前 1 d,将 1.0×10^5 对数期生长的细胞接种于 24 孔培养板,0.2 mL/well,培养过夜。次日进行转染。基本操作按说明书进行。分组:(1) siRNA 组:含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 中含不同浓度的已用脂质体包埋的 siRNA。(2) 空载对照组 (简称对照组):siRNA 组的 siRNA 用 RPMI-1640 替代。转染后于不同时间采用胰酶消化收取细胞,进行时效试验和量效试验。时效试验选用 24 h、48 h、72 h 3 个作用点,量效实验时,siRNA 浓度分别是 3.125 nmol/L、6.25 nmol/L、12.5 nmol/L。

3 转染后癌细胞 *Cripto* mRNA 水平检测

分别于转染不同时间收集细胞,根据文献^[7],采用实时定量 PCR 检测 *Cripto* 基因 mRNA 表达情况。

4 结肠癌细胞 VEGF 表达

4.1 mRNA 水平 采用 Northern blotting 检测。利用 Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak 公司)测定 Northern blotting 条带净灰度值,并与内参照 β -actin 的测定结果相比较,计算其比值。

4.2 蛋白水平 VEGF 蛋白表达含量采用免疫荧光标记法检测。收集 5×10^5 细胞,4 °C,加入 2% 多聚甲醛固定约 30 min 后,加穿透缓冲液 (PBS 含 1% AB 型血清,1% 的吐温-20) 洗涤 2 次,加 VEGF 抗体 (1:50) 50 μ L,4 °C 温育 1 h;洗涤 2 次,加 FITC 标记的 IgG (1:100) 50 μ L,4 °C 温育 30 min;洗涤 2 次, FACSClibur 型流式细胞仪测定。

5 裸鼠肿瘤组织内 VEGF 蛋白表达

将裸鼠随机分为 2 组:siRNA 组和对照组,每组 5 只。转染 72 h 后,收集 12.5 nmol/L 组和对照组癌细胞,以 1 \times PBS 洗涤,重悬,按照每只 1×10^6 分别注射进 siRNA 组和对照组裸鼠背部。观察裸鼠成瘤的时间、成瘤率;30 d 后处死,分离肿瘤组织,称重。采用生物素卵白素过氧化物酶系统 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) 对瘤组织进行免疫组化染色,具体操作按照说明书进行。其中 VEGF 单抗和 IgG 工作浓度分别为 1:20 和 1:250。对照:用 PBS 缓冲液代替 VEGF 单抗做阴性对照,用对 VEGF 高表达的乳腺癌组织为阳性对照。VEGF 蛋白表达均以胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性。在每张切片上随机选取 10 个视野,根据细胞染色强度分为阴性:细胞无着色 (0 分);弱阳性:黄色 (1 分);中度阳性:棕黄 (2 分);强阳性:棕褐 (3 分)。根据下列计算公式计算每张切片的平均染色强度,IS (intensity score) = [(0 \times F0) + (1 \times F1) + (2 \times F2) + (3 \times

F3)], F = % × 10 视野。

6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用以 SPSS 10.0 统计学软件进行处理。

结 果

1 siRNA 转染对结肠癌细胞 *Cripto* mRNA 的影响

为研究 *Cripto* 基因在结肠癌细胞中的功能,本研究采用 *Cripto* siRNA 转染结肠癌 LS-174T 细胞。该细胞 *Cripto* 基因过表达。我们发现,与对照组比较,转染组 *Cripto* mRNA 下调,且呈浓度和时间依赖性。

2 结肠癌细胞 VEGF 表达

2.1 mRNA 水平 各个剂量组在作用细胞 12 h 后, VEGF 的 mRNA 水平就开始出现降低;随着作用时间的延长, VEGF mRNA 的降低更加明显 ($P < 0.05$)。同时发现, VEGF mRNA 水平降低与 siRNA 浓度密切相关 ($P < 0.05$), 见表 1、图 1。

表 1 *Cripto* siRNA 对结肠癌细胞 LS-174T VEGF mRNA 水平的影响

Tab 1 Effects of *Cripto* siRNA on VEGF mRNA in colon cancer cell line LS-174T ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	24 h	48 h	72 h
Control	0.718 ± 0.064	0.710 ± 0.090	0.698 ± 0.066
3.125 (nmol/L)	0.476 ± 0.045	0.418 ± 0.039 [△]	0.351 ± 0.039 [▲]
6.25 (nmol/L)	0.429 ± 0.035 [*]	0.366 ± 0.027 ^{*△}	0.256 ± 0.025 ^{*▲}
12.5 (nmol/L)	0.338 ± 0.039 [#]	0.286 ± 0.027 ^{#△}	0.192 ± 0.018 ^{#▲}

* $P < 0.05$ vs 3.125 nmol/L; # $P < 0.01$ vs 6.25 nmol/L; Δ $P < 0.05$ vs 24 h; \blacktriangle $P < 0.05$ vs 48 h.

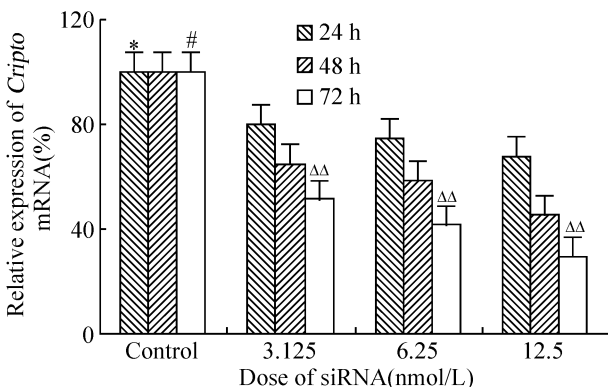


Fig 1 *Cripto* mRNA level in colon cancer cell line LS-174T treated with siRNA. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.01$ vs 3.125 nmol/L; # $P < 0.01$ vs 6.25 nmol/L; Δ $P < 0.01$ vs 24 h; \blacktriangle $P < 0.01$ vs 48 h.

图 1 *Cripto* siRNA 处理结肠癌 LS-174T 细胞后 *Cripto* mRNA 的表达水平

2.2 蛋白水平 VEGF 基因蛋白表达产物在结肠癌细胞中稳定高表达。以不同浓度的 *Cripto* siRNA 转染处理结肠癌细胞,分别于 24 h、48 h、72 h 收集细胞,通过免疫荧光标记法检测发现, VEGF 蛋白表达的阳性细胞百分率逐渐降低,且呈时间和浓度依赖性。

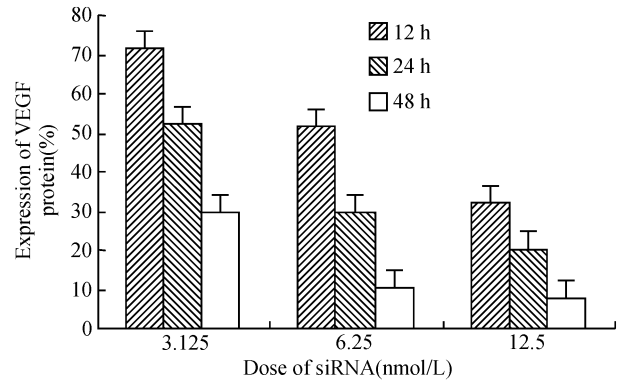


Fig 2 Inhibition of *Cripto* siRNA on VEGF protein in colon cancer cells. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

图 2 *Cripto* siRNA 转染对结肠癌细胞 VEGF 蛋白水平的抑制

3 裸鼠肿瘤组织 VEGF 蛋白表达

对裸鼠肿瘤组织进行免疫组化染色, VEGF 平均染色强度转染组为 (1.20 ± 0.08), 对照组为 (2.38 ± 0.10), 2 组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

讨 论

VEGF 家族成员包括 VEGF-A (即通常所指的 VEGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和胎盘生长因子 (placenta growth factor, PIGF)。VEGF mRNA 经不同的剪切方式可得到 7 种不同的同工型,其氨基酸残基数分别为 121、145、148、165、183、189、206,体内最常见的是 VEGF165, VEGF206 较少见,并且只在胎肝中有发现。近年研究证明, VEGF 在组织器官的发生、正常状态的维持、多种肿瘤的发生、发展以及转移中都发挥着重要作用^[8-10]。

前期研究发现,采用 *Cripto* 反义寡核苷酸处理结肠癌细胞系 LS-174T 可明显抑制端粒酶活性,抑制肿瘤细胞生长^[7]。本研究继续采用 RNAi 技术,从体内、体外观察了 siRNA 对结肠癌细胞 VEGF 的影响。

RNAi 是近年来发现的一种调节 mRNA 的生物学现象,能够使基因的 mRNA 被相应的双链 RNA 分子敲除,其效果要远强于反义 RNA^[11]。RNAi 最主要的功能在于可以调节和关闭基因的表达,进而调

控细胞的各种高级生命活动。而 siRNA 是指 RNAi 过程中在细胞内产生的长约 21 - 25 核苷酸 (nt) 的小双链 RNA 分子,是 RNAi 作用机制的重要中间效应分子。而且已有人工合成的 siRNA,具有明显的敲除相应基因 mRNA 的效果^[12]。在基因研究领域中, RNAi 和 siRNA 已经成为功能基因组学研究的重要工具,并开始应用于疾病防治研究等多个方面。

本研究针对 *Cripto* 基因特点,设计并通过化学合成法构建了 *Cripto* siRNA,转染结肠癌 LS - 174T 细胞后,采用实时定量 PCR 直接检测转染前后 *Cripto* mRNA 水平。结果发现,转染组 *Cripto* mRNA 被有效地抑制,且呈浓度和时间依赖性。另外发现,3.125 nmol/L 的 siRNA 即可明显抑制 *Cripto* mRNA 水平,所需浓度明显低于反义寡核苷酸^[7]。验证了 siRNA 的高效性。说明我们设计的 *Cripto* siRNA 可作为研究 *Cripto* 基因功能的有力工具。

接着,我们进一步检测了 *Cripto* siRNA 转染对结肠癌细胞 VEGF 的影响。收集转染的细胞,分别采用 Northern blotting 和免疫荧光法检测 *Cripto* mRNA 和蛋白水平。结果发现,转染组癌细胞 VEGF mRNA 和蛋白水平明显低于空白对照组和空载对照组,且呈浓度和时间依赖性。说明 *Cripto* siRNA 转染可下调 VEGF 水平。

我们进一步采用转染的细胞接种裸鼠,采用免疫组化检测裸鼠肿瘤组织 VEGF,结果发现,转染组的裸鼠肿瘤组织 VEGF 蛋白表达明显低于对照组。提示 *Cripto* siRNA 转染抑制了裸鼠体内新生血管形成。

本研究提示,采用 siRNA 沉默结肠癌细胞 *Cripto* 基因,可在一定程度上抑制 VEGF 表达,从而抑制结肠癌组织血管形成,其意义值得进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Arii S, Ishigami S, Mori A, et al. Implication of VEGF and MMPs in hepatic metastasis of human colon cancer [J]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1998, 99 (7): 436 - 440.
- [2] Widel MS, Widel M. Mechanisms of metastasis and molecular markers of malignant tumor progression. I Colorectal cancer [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2006, 60: 453 - 470.
- [3] Adamson ED, Minchiotti G, Salomon DS. Cripto: a tumor growth factor and more [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 190 (3): 267 - 278.
- [4] Xing PX, Hu XF, Pietersz GA, et al. Cripto: a novel target for antibody - based cancer immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (11): 4018 - 4023.
- [5] Normanno N, De Luca A, Salomon DS, et al. Epidermal growth factor - related peptides as targets for experimental therapy of human colon carcinoma [J]. *Cancer Detect Prev*, 1998, 22 (1): 62 - 67.
- [6] De Angelis E, Grassi M, Gullick WJ, et al. Expression of Cripto and amphiregulin in colon mucosa from high risk colon cancer families [J]. *Int J Oncol*, 1999, 14 (3): 437 - 440.
- [7] 范 钰, 郑 树, 赵 刚. 脂质体介导的 cripto 反义寡核苷酸抑制结肠癌细胞端粒酶活性 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22 (4): 762 - 765.
- [8] Favier J, Plouin PF, Corvol P, et al. Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161 (4): 1235 - 1246.
- [9] McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/F1k - 1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87 (9): 4238 - 4244.
- [10] Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, et al. Tumor - associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161 (3): 947 - 956.
- [11] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391 (6669): 806 - 811.
- [12] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21 - nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411 (6836): 494 - 498.