

# 应用RNA干扰沉默血管内皮生长因子基因抑制HCT116细胞增殖的实验研究

吕伟, 张超, 郭红, 刘伟, 郝迎学

吕伟, 张超, 刘伟, 郝迎学, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院普外科 重庆市 400038

郭红, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院消化科 重庆市 400038  
吕伟, 男, 1972-2-27 生, 江苏省金坛市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤的外科及分子生物治疗研究。

重庆市自然科学基金资助项目, No. csfc-2005BB5291

通讯作者: 张超, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 第三军医大学附属西南医院普外科. zhangchao@163.com

电话: 023-68765274

收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-30

## Suppression of HCT116 cell proliferation by silencing vascular endothelial growth factor gene with RNA interference

Wei Lv, Chao Zhang, Hong Guo, Wei Liu, Ying-Xue Hao

Wei Lv, Chao Zhang, Wei Liu, Ying-Xue Hao, Department of General Surgery, the Affiliated Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China  
Hong Guo, Department of Gastroenterology, the Affiliated Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing, No. csfc-2005BB529

Correspondence to: Chao Zhang, Department of General Surgery, the Affiliated Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China. zhangchao@163.com

Received: 2005-10-14 Accepted: 2005-10-30

## Abstract

**AIM:** To observe whether the vascular endothelial growth factor (VEGF) short hairpin RNA (shRNA) expressed by recombinant plasmid Pavu6+27-VEGF siRNA in cells can effectively inhibit the proliferation of human colon carcinoma cell line HCT116.

**METHODS:** The constructed recombinant plasmid with the expression of shRNA was transfected into the human colon carcinoma cell line HCT116, and the empty plasmid (Pavu6+27) was transfected into the same cell line as controls. After screened with G418, flow cytometry was used to detect the distribution of the HCT116 cell cycles. The inhibitory rate of the cell growth was detected by MTT assay.

**RESULTS:** The recombinant Pavu6+27-VEGF siRNA effectively inhibited the proliferation of the cell line HCT116, and the inhibitory rates were significantly

increased as compared with those in the controls at 24, 48, and 72 h ( $15.32 \pm 2.02\%$ ,  $28.54 \pm 3.29\%$ ,  $40.32 \pm 3.56\%$  vs  $5.64 \pm 1.42\%$ ,  $8.65 \pm 2.30\%$ ,  $15.32 \pm 3.52\%$ ,  $P < 0.05$ ). The ratio of cells at  $G_0/G_1$  stage was markedly increased ( $74.37 \pm 4.54\%$  vs  $71.13 \pm 5.14\%$ ), while the ratio of cell at S stage was significantly decreased ( $11.90 \pm 3.44\%$  vs  $14.97 \pm 4.33\%$ ,  $P < 0.05$ ) in the recombinant plasmid transfected cells as compared with that in the controls. The empty plasmid had no such effect on the same cell line.

**CONCLUSION:** The shRNA expressed by the recombinant plasmid Pavu6+27-VEGF siRNA in cells can effectively inhibit the proliferation of the cell line HCT116.

**Key Words:** RNA interference; Short hairpin RNA; Vascular endothelial growth factor; Cell proliferation

Lv W, Zhang C, Guo H, Liu W, Hao YX. Suppression of HCT116 cell proliferation by silencing vascular endothelial growth factor gene with RNA interference. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(24):2870-2873

## 摘要

**目的:** 观察Pavu6+27-VEGF siRNA重组体在细胞体内表达的血管内皮生长因子短发夹状RNA (shRNA) 能否有效地抑制人大肠癌HCT116细胞株的增殖。

**方法:** 将自行构建的表达短发夹状RNA的重组质粒转染到人大肠癌HCT116细胞株中, 以空质粒Pavu6+27转染为对照, 经G418筛选, 流式细胞技术分析细胞周期分布, MTT比色法检测细胞的生长抑制率。

**结果:** Pavu6+27-VEGF siRNA重组体能有效地抑制HCT116细胞株的生长增殖, 24、48、72 h移植率分别为  $15.32 \pm 2.02\%$ 、 $28.54 \pm 3.29\%$ 、 $40.32 \pm 3.56\%$ , 与对照组 ( $5.64 \pm 1.42\%$ 、 $8.65 \pm 2.30\%$ 、 $15.32 \pm 3.52\%$ ) 相比有显著差异 ( $P < 0.05$ )。细胞周期中  $G_0/G_1$  比例升高, S期比例明显下降, 而空质粒Pavu6+27转染对HCT116细胞株增殖无抑制作用, 对细胞周期改变无影响。

**结论:** Pavu6+27-VEGF siRNA重组体在细胞内表达的短发夹状RNA 能有效抑制人大肠癌细胞的增殖, 为质粒介导的RNAi技术运用于大肠癌的基因治疗提供一定的实验依据。

关键词: RNA干扰; 短发夹状RNA; 血管内皮生长因子; 细胞增殖

吕伟, 张超, 郭红, 刘伟, 郝迎学. 应用RNA干扰沉默血管内皮生长因子基因抑制HCT116细胞增殖的实验研究. 世界华人消化杂志 2005;13(24): 2870-2873

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2870.asp>

## 0 引言

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象, 它是指当细胞中导入与内源性mRNA编码区同源的双链RNA(dsRNA)时, 该mRNA发生降解而导致基因沉默的现象, 这种现象发生在转录后水平, 又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing)<sup>[1]</sup>. 体外合成的长链dsRNA已被证明在大多数哺乳动物细胞中会产生强烈的细胞毒反应<sup>[2]</sup>, 而人工合成的短链RNA(21-22 nt)虽可避免这种非特异性作用, 但其时效短, 最长只能维持1 wk<sup>[3]</sup>. 表达载体可帮助RNAi克服上述缺点, 因此, 利用载体在细胞内转录生成dsRNA成为RNAi技术运用的主要手段<sup>[4]</sup>. 我们以质粒Pavu6+27(由美国Michigan大学生物化学系David Engelke博士惠赠, U6为启动子)为基础, 将针对VEGF表达短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)的重组质粒转染入人大肠癌HCT116细胞, 以期在细胞内表达shRNA而诱导RNAi效应并特异地抑制HCT116细胞增殖, 为大肠癌的基因治疗提供新的靶点和思路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌Jm109(由第三军医大学中心实验室保存), 含U6启动子的质粒Pavu6+27(由美国Michigan大学生物化学系David Engelke博士惠赠), 人大肠癌HCT116细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心. DMEM高糖培养基、标准小牛血清购自美国Hyclone公司; DOTAP脂质体转染试剂购自美国Roche公司; 四氮唑蓝购于Sino-American Biotechnology公司; 流式细胞仪由美国Coulter公司生产; 酶标仪为HTS-7000生物分析仪; 其他试剂均为进口或国产分析纯产品. 表达VEGF shRNA质粒(Pavu6+27-VEGF siRNA)由本室前期实验构建、鉴定并保存<sup>[5]</sup>. VEGF的cDNA全序列及所选择的干涉位点参照资料<sup>[6]</sup>设计(潜在靶位点需通过GENBANK数据库的BLAST进行分析). Pavu6+27-VEGF siRNA所插入的VEGF干涉序列(只列出正链序列)为: 5'-GGAGTACCTGATGAGATC-3'(19 nt, 由上海SAN GON公司合成), Pavu6+27-VEGF siRNA含有新霉素抗性基因(neo<sup>r</sup>基因)作为正选择的标志.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 细胞培养于含100 mL/L灭活小牛血清,  $1 \times 10^5$  U/L青霉素, 100 mg/L链霉素的DMEM高糖

培养液中, 于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验. 采用Roche公司的DOTAP脂质体转染试剂盒包裹经灭菌处理的重组质粒(质粒: 脂质体=1: 6)转染前一天, 换取新鲜培养液(含100 mL/L小牛血清的DMEM高糖培养液, 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱中培养)后调整浓度为 $2 \times 10^8$  /L, 以每孔2 mL接种于6孔培养板中培养, 待细胞增至60-80%时, 将质粒-脂质体复合物5-6 mL(将5 μg质粒以HBS缓冲液稀释为0.1 g/L终体积50 μL, 将30 μL DOTAP加入HBS缓冲液至终体积100 μL, 混合后制备成质粒-脂质体复合物)转染至细胞中, 18 h后弃去转染液, 换含新鲜培养液继续培养, 弃去原培养液, 用含G418 300 mg/L的DMEM培养液进行筛选收集G418抗性细胞. 转染了Pavu6+27-VEGF siRNA的HCT116细胞筒写成Pavu6+27-VEGF siRNA HCT116细胞. 转染空质粒的Pavu6+27的HCT116细胞筒写成Pavu6+27 HCT116作为对照.

1.2.2 MTT比色法检测细胞的抑制率 MTT比色法参照参考文献[7]. 取对数生长期的Pavu6+27-VEGF siRNA HCT116、Pavu6+27 HCT116、HCT116细胞按每孔 $5.0 \times 10^3$ 的密度接种于96孔板中, 每种细胞接种24(3 × 8)孔, 设DOTAP脂质体为空白对照(1 × 8)孔. 培养细胞于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度, 24 h后更换培养基, 继续培养24、48和72 h. 每个时间点重复设8孔. 显色, 每孔加入MTT液(5 g/L)20 μL, 37 °C孵育4 h后弃去上清, 轻轻振荡10 min. 在酶联免疫检测仪(HTS-7000生物分析仪)上以570 nm波长测定各孔光吸收值(A值). 以培养时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线. 计算转染前后两组细胞的生长抑制率: 生长抑制率=(对照组A值-实验组A值)/对照组A值 × 100%.

1.2.3 流式细胞技术分析细胞周期分布的影响 对数生长期的细胞用胰酶消化后, 以 $1.0 \times 10^8$  /L的密度传代、接种, 贴壁后加入DMEM培养基培养24 h, 加入新培养液, 设加等体积DOTAP脂质体作为对照组. 继续培养至72 h, 胰酶消化成单细胞悬液, 冰PBS洗涤两次, 1 000 r/min离心5 min. 弃上清, 缓慢加入-20 °C预冷的250 mL/L乙醇, 4 °C过夜. 取细胞悬液, PBS洗涤, 2 000 r/min离心5 min后, 弃上清. PI染液1.0 mL染30 min, 混合液过300目滤网以除去杂质, 488 nm激发波长测定样品, 620 nm带通滤片检测PI荧光. 每样本收集多于10 000个荧光信号. 细胞周期分析软件MultiCycle分析得到DNA指数(DNA index, DI)细胞周期数值, 并以下列公式计算细胞增殖指数(proliferation index, PI):  $PI = (S\% + G2\%) / (G1\% + S\% + G2\%) \times 100$

统计学处理 实验数据以mean ± SD表示, 采用SPSS10.0 for Windows统计软件, 进行单因素方差分析和显著性检验. 预先用Homogeneity of Variances进行方差齐性检验, 如方差齐采用LSD检验, 如方差不齐采用Tamhane T2检验.  $P < 0.05$

为有显著性差异,  $P < 0.01$  为有非常显著性差异。

## 2 结果

2.1 MTT比色法检测细胞的抑制率 MTT实验结果显示: DOTAP脂质体介导的表达VEGF短发夹状RNA重组质粒(Pavu6+27-VEGF siRNA)对HCT-116细胞有明显生长抑制作用, 而空载体对细胞生长无抑制作用(组间比较 $P < 0.05$ ) (表1)。

表1 MTT比色法检测重组质粒、空质粒转染对细胞的抑制率(%), mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ )

分组	抑制率 (%)		
	24 h	48 h	72 h
脂质体处理	0	0	0
空质粒转染	5.64 $\pm$ 1.42	8.65 $\pm$ 2.30	15.32 $\pm$ 3.52
重组质粒转染	15.32 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	28.54 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>	40.32 $\pm$ 3.56 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

2.2 流式细胞仪检测细胞周期分布的改变 转染了重组质粒的Pavu6+27-VEGF siRNA HCT116细胞株,  $G_0/G_1$ 期细胞比例增高, 另一方面S期细胞比例降低, 细胞的增殖指数明显降低. 转染空质粒的Pavu6+27的HCT116细胞的增殖指数无明显改变. 此结果说明针对VEGF靶基因设计的短发夹状RNA对大肠癌HCT116细胞株的增殖有明显抑制作用(表2)。

表2 流式细胞术分析重组质粒、空质粒转染后对结肠癌细胞周期分布的影响(mean  $\pm$  SD)

分组	各细胞周期的分布 (%)		
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
脂质体处理	68.13 $\pm$ 2.14	18.40 $\pm$ 2.15	13.50 $\pm$ 2.46
空质粒转染	71.13 $\pm$ 5.14	14.97 $\pm$ 4.33	13.90 $\pm$ 3.04
重组质粒转染	74.37 $\pm$ 4.54 <sup>a</sup>	11.90 $\pm$ 3.44 <sup>b</sup>	13.73 $\pm$ 7.80

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

## 3 讨论

肿瘤的恶性增殖受到多种因素的影响, 其中肿瘤血管生长对实体瘤的生长起重要作用, 是影响肿瘤生物行为的重要因素<sup>[8]</sup>. 血管内皮生长因子(VEGF)是一种重要的促血管形成因子, 通过增加微血管的通透性和特异性的与血管内皮细胞受体结合, 促进血管内皮细胞的分裂和增殖, 进而导致新生血管的生成, 具有促血管形成和增加血管通透性的双重功能, 在肿瘤的发展、转移及预后等方面均起着重要的作用<sup>[9]</sup>. 它通过与两种选择性表达在血管内皮细胞上的高亲和力酪氨酸受体(flt21和KDR/flk21)的结合来发挥作用. 研究表明, 在大肠癌中VEGF表达明显增高, VEGF表达与大肠癌生长、转移及肿瘤血管密度密切相关, 并可作为判断预后的指标<sup>[10]</sup>. 阻断VEGF表达

可达到抑制肿瘤生长及转移的目的<sup>[11]</sup>.

因此如何有效的抑制VEGF的表达是肿瘤治疗的关键所在. 目前研究较多的有抗VEGF及VEGFR的单克隆抗体<sup>[12]</sup>, 反义寡核苷酸基因干涉<sup>[13]</sup>, VEGF片段<sup>[14]</sup>等, 但效果不甚理想. 近几年来兴起的RNA干扰技术, 为肿瘤分子生物治疗开辟了新的途径<sup>[15]</sup>. 与传统基因沉默技术相比, 具有效果强、持续时间长、技术流程简便、周期短, 以及在细胞内表达的稳定性、可传递性、高效性等优势, 目前这一技术已在肿瘤的基因治疗方面显示出诱人的前景. 我们即采用以质粒为载体构建重组体的方法, 将siRNA对应的DNA双链序列克隆入载体内, 位于RNA聚合酶III的启动子后, 这样就能在体内表达所需的siRNA分子. 该方法的优点是使siRNA直接在体内得到稳定表达, 是用于RNAi长期研究的较好方法. 我们将在细胞体内表达的VEGF shRNA的Pavu6+27-VEGF siRNA重组体通过脂质体法导入人大肠癌HCT116细胞株, 结果显示, 能显著抑制肿瘤细胞的增殖(与正常对照和空载体Pavu6+27转染对照). 本实验结果为质粒介导的RNAi技术运用于肿瘤的基因治疗提供一定的理论依据. 但如何提高其转染率(使其达到80-90%)、如何检测质粒在细胞内最长的作用时间、表达shRNA的效率及表达的shRNA能否稳定存在等一系列问题均有待进一步研究。

## 4 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 2 Scherr M, Morgan M A, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem* 2003; 10: 245-256
- 3 Lee SS, Lee RY, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet* 2003; 33: 40-48
- 4 Thiji R, Brummelkamp, Bernards R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 5 吕伟, 郝嘉, 郝迎学, 张超. RNAi抑制大肠癌HCT116细胞株VEGF-mRNA表达的实验研究. 第三军医大学学报 2005; 27: 1089-1092
- 6 Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 2004; 64: 3365-3370
- 7 Chen HH, Zhou HJ, Fang X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives *in vitro*. *Pharmacol Res* 2003; 48: 231-236
- 8 Rosen LS. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist* 2005; 10: 382-391
- 9 Hotz HG, Hines OJ, Masood R, Hotz B, Foitzik T, Buhr HJ, Gill PS, Reber HA. VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer. *Surgery* 2005; 137: 192-199
- 10 Bergsland EK. Vascular endothelial growth factor as a therapeutic target in cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2004; 61:S4-S11
- 11 Brekken CA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk1) activity by a



- monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5117-5124
- 12 Lu PY, Xie FY, Woodle MC. Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics. *Trends Mol Med* 2005; 11: 104-113
- 13 Im SA, Kim JS, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Cho MS, Seong CM, Lee SN, Hong YK, Yung WK. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus mediated antisense-VEGF. *Br J Cancer* 2001; 84 : 1252-1257
- 14 Jia H, Jezequel S, Lohr M, Shaikh S, Davis D, Soker S, Selwood D, Zachary I. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 164-173
- 15 Fraser A. RNA interference: human genes hit the big screen. *Nature* 2004; 428: 375-378

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

## 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下.

### 1 征文内容

本次会议的征文内容包括:(1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果;(2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应症和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果;(3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训;(4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择;(5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验;(6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验;(7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验;(8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物.

### 2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄:(1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, email: kewe1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, email: ssshhhqq66@163.com.

### 3 其他

本次会议可授予国家级继续教育I类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知. 欢迎广大相关领域工作及研究人员参加.