

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.05.005

# 慢病毒介导的 siRNA 干扰乳腺癌 MCF-7 细胞 VEGF-C 表达的实验

郭宝平, 岑洪, 谭晓虹, 陆永奎

## Down-regulation of Vascular Endothelial Cell Growth Factor-C Expression in MCF-7 Cells with Lentivirus-mediated Small Interfering RNA Vectors

GUO Bao-ping, CEN Hong, TAN Xiao-hong, LU Yong-kui

Department of Chemotherapy, Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding Author: CEN Hong, E-mail: cen\_hong@163.com

**Abstract: Objective** To study the reduction of VEGF-C expression of MCF-7 cells interfered with lentivirus-mediated small interfering RNA vectors. **Methods** Lentivirus-mediated small interfering RNA vectors were constructed and transfected into breast cancer MCF-7 cells. Real-time PCR was performed to detect the expression of VEGF-C. The proportion of transfected cells and the knock-down rate of VEGF-C were calculated. **Results** The transduction rate of Lentivirus-mediated small interfering RNA was more than 80%. mRNA expression of VEGF-C decreased nearly 50%. **Conclusion** Lentivirus-mediated small interfering RNA vectors had a high transfection rate and might reduce the expression of VEGF-C significantly.

**Key words:** VEGF-C; RNA interference; Lentivirus; MCF-7

**摘要:目的** 研究慢病毒载体介导的 siRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞系 VEGF-C 表达的敲减作用。**方法** 构建慢病毒 VEGF-C/siRNA 载体,转染乳腺癌 MCF-7 细胞,采用 Real-time PCR 检测 MCF-7 细胞在转染前后 VEGF-C 的 mRNA 表达,计算其转染效率和 VEGF-C 敲减率。**结果** 慢病毒 VEGF-C/siRNA 转染效率超过 80%,其 VEGF-C 的 mRNA 表达敲减率达 50%。**结论** 慢病毒 VEGF-C/siRNA 转染率高,能有效敲减 VEGF-C 的 mRNA 表达。

**关键词:** 血管内皮生长因子 C; RNA 干扰; 慢病毒载体; MCF-7

中图分类号:R737.9;R73-3 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)05-0502-03

### 0 引言

乳腺癌早期即可发生淋巴道转移,血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)是血管内皮生长因子家族的新成员,目前认为 VEGF-C 诱导肿瘤淋巴管生成是促进肿瘤淋巴转移的重要因素,阻断 VEGF-C 的作用将有可能成为肿瘤治疗的有效靶点。本研究通过慢病毒介导的 siRNA,封闭肿瘤细胞 VEGF-C 表达,观察其阻断效果,为临床实践提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂和仪器

收稿日期:2010-05-18;修回日期:2010-11-12

基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科自 0991230)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学附属肿瘤医院化疗三科

通信作者:岑洪, E-mail: cen\_hong@163.com

作者简介:郭宝平(1984-),男,硕士,住院医师,主要从事肿瘤侵袭转移机制研究

乳腺癌 MCF-7 细胞株购于中国科学院上海细胞库, RNA 提取试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司产品,反转录试剂为 Promega 公司产品,胎牛血清和 DMEM 培养液为 Gibco 公司产品,荧光定量试剂 SYBR Master Mixture 和 Real-time PCR 仪器为 TAKARA 公司产品。

#### 1.2 慢病毒载体构建

人类 VEGF-C 的 siRNA 慢病毒载体委托上海吉凯基因化学技术有限公司构建。靶序列参照文献<sup>[1]</sup>,合成 3 条 siRNA 质粒,预实验确认抑制效率最高序列(5'-GGAGGCTGGCAACATAACA-3'),构建慢病毒。该载体包含有报告基因绿色荧光蛋白,对照载体为不含 siRNA 序列的单纯绿色荧光蛋白慢病毒。

#### 1.3 靶细胞准备

液氮冻存的 MCF-7 细胞解冻后离心移至超净台,吸去冻存液上清,加入 1ml 新鲜的完全培养液重悬细胞,将细胞悬液接种至含 10% 胎牛血清

DMEM 培养液的 6cm 培养皿中,轻轻晃匀后置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养,次日更换一次培养液后继续培养。待细胞生长满培养皿底 90% 时进行传代,继续培养。

#### 1.4 靶细胞慢病毒感染

取对数生长期的靶细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液,将细胞悬液(细胞数约为  $5 \times 10^4$ )接种于 6 孔板中,37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养待细胞融合度达到约 30%,加入病毒,根据预实验,设定病毒的 MOI 值(病毒数与细胞数量的比值)为 40,12 h 后观察细胞状态:如果没有明显的细胞毒性作用,继续培养 24 h 后更换培养液;如果有明显的细胞毒性作用,立即更换培养液,感染 3 天后观察慢病毒报告基因 GFP 的表达情况,感染效率大于 50% 者继续培养,待感染时间达到 5 天后收集细胞,抽提 RNA 进行 RT-PCR 检测实验;感染效率低于 50% 的实验组,重新进行感染实验。实验分为三组:(1)CON 组:正常目的细胞、未感染任何病毒的细胞组(Control);(2)NC 组:正常目的细胞、加阴性对照病毒感染的细胞组(Negative Control,含 GFP,不含 siRNA);(3)KD 组:正常目的细胞、加 RNAi 靶点病毒感染的细胞组(Knock Down)。

#### 1.5 Real-Time PCR 检测基因表达

VEGF-C 引物和 Actin 引物采用软件 Beacon designer 2 设计,引物由吉凯基因化学技术有限公司合成,序列信息 Actin:上游引物 5'-GGCGGCAC-CACCATGTACCCT-3',下游引物 5'-AGGGGC-CGGACTCGTCATACT-3',扩增产物 202bp; VEGF-C:上游引物 5'-AGGCTGGCAACATAA-CAGAGA-3',下游引物 5'-TCCCCACATCTATA-CACACCTC-3',扩增产物 161bp。总 RNA 抽提、RNA 反转录根据操作说明书进行。Real-time PCR 检测设定程序为两步法:预变性 95℃,15s;之后每一步变性 95℃,5s;退火延伸 60℃,30s;共进行 45 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值,制作熔解曲线:PCR 结束后,95℃ 变性 1 min,然后冷却至 55℃,使 DNA 双链充分结合,从 55℃ 开始到 95℃,每一步增加 0.5℃,保持 4s,同时读取吸光值。PCR 结束后,根据变性过程中的荧光值变化绘出每个样品的熔解曲线,分析产物的均一性,判断 SYBR Green Real-Time PCR 定量结果的可靠性。

#### 1.6 基因表达量的计算和统计学方法

按照下列公式计算样本中 VEGF-C 的相对表达量: $\Delta Ct$ (目的基因) = 目的基因 Ct - 内对照基因 Ct;  $\Delta\Delta Ct$  =  $\Delta Ct$ (目的基因) -  $\Delta Ct$ (标准值);目的基因的相对拷贝量为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。数据处理应用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$  为差异有统计学

意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞转染结果

未转染(CON)细胞无绿色荧光表达,阴性对照(NC)组和基因敲减(KD)组可观察到绿色荧光表达,见图 1。荧光观察结果目的细胞的感染效率超过 80%,表明慢病毒 VEGF-C/SiRNA 载体能高效转染 MCF-7 细胞。

### 2.2 Real-time PCR 检测基因敲减水平(2- $\Delta\Delta Ct$ 分析法)

MCF-7 细胞中,NC 组 VEGF-C 基因的表达与 CON 组无显著性差异;相对 NC 组,KD 组的 VEGF-C 基因敲减效率约为 50% ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 溶解曲线分析

从图 2 中可看出,图中没有出现杂峰,也未出现主峰的异常增宽,表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增,定量分析结果可靠。

## 3 讨论

VEGF-C 是主要的淋巴管生长因子,在一些正常的组织中表达,例如大肠和乳腺的导管上皮、甲状腺、卵巢和前列腺<sup>[2]</sup>;在许多肿瘤组织中高表达<sup>[3-6]</sup>。VEGF-C 在肿瘤微环境中过表达与乳腺癌患者淋巴结转移<sup>[5]</sup>及预后不佳相关<sup>[4,7]</sup>。有研究描述了肿瘤临床病理因素与循环中 VEGF-C 水平的关系,发现患者血清 VEGF-C 水平比健康对照组高,有淋巴结转移的患者 VEGF-C 水平比无转移的患者高<sup>[8]</sup>。Kimura 等<sup>[9]</sup>报道术前血清 VEGF-C 水平能预测术后淋巴结的转移和复发倾向。Mitsushashi 等<sup>[10]</sup>报告治疗前血清 VEGF-C 水平与宫颈鳞癌分期,肿瘤大小和疾病复发及持续存在密切相关。肿瘤来源的 VEGF-C 被认为通过诱导淋巴管生成,促使淋巴结转移,导致肿瘤进展<sup>[11-13]</sup>。作为一个淋巴管生长因子,VEGF-C 通过活化淋巴内皮细胞上的酪氨酸激酶受体 VEGFR-3 起作用<sup>[11]</sup>。阻断 VEGF-C 的作用将有可能成为肿瘤治疗的有效靶点。

siRNA (small interfering RNA) 是一种小 RNA 分子(21-25 核苷酸),能够诱导序列特异的目标基因沉寂,迅速阻断基因活性,已广泛用于科研,基于 siRNA 的临床药物开发也正在进行。目前慢病毒被广泛地应用于 RNA 干扰的研究中。慢病毒载体(Lentiviral vector)较反转录病毒载体宿主范围更广,能够有效感染周期性和非周期性细胞,实现在多种类型细胞中及转基因小鼠中特异而稳定的基因功能性沉默,为在人和动物组织的原代细胞中快速而高效地抑制特定基因的表达,研究基因功能,提

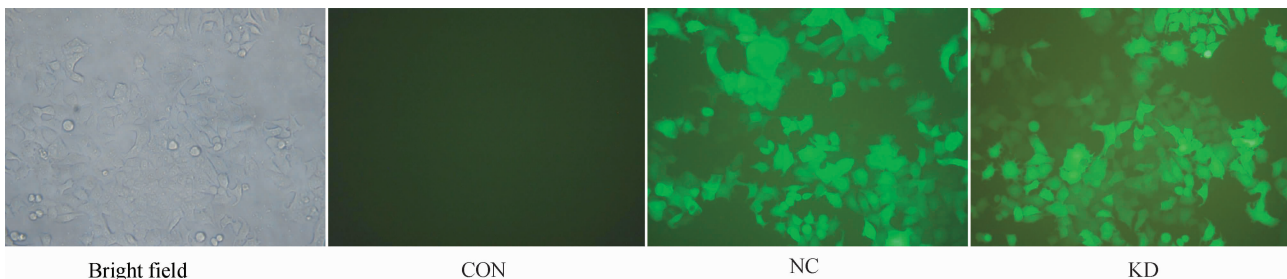
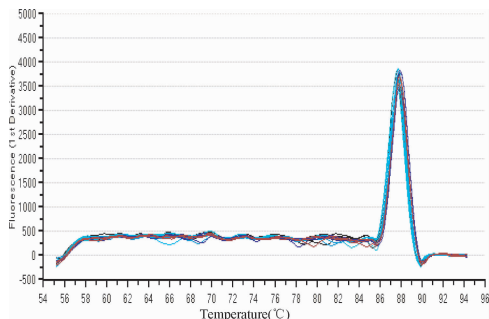
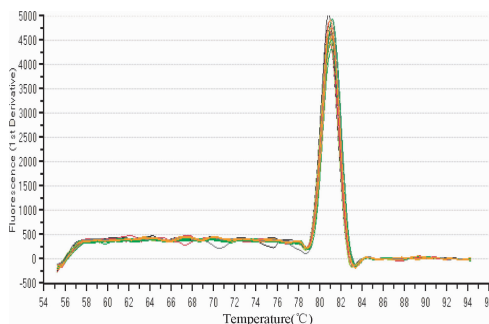


图 1 慢病毒 VEGF-C/siRNA 转染后 MCF-7 细胞 GFP 表达情况(×40)

Figure 1 GFP expression of MCF-7 transfected with Lentivirus-mediated VEGF-C/siRNA vectors(×40)



Melting curve analysis of Actin



Melting curve analysis of Actin

图 2 溶解曲线分析结果

Figure 2 Melting curve analysis data

供了可能性。

为了研究 VEGF-C/VEGFR-3 轴在肿瘤细胞侵袭中的作用,本研究使用 VEGF-C 特异性的慢病毒 siRNA 载体敲减 VEGF-C 在 MCF-7 细胞系中的表达,观察其转染和敲减效率,为今后进一步研究 VEGF-C/VEGFR-3 轴对细胞的迁移和侵袭能力的影响,打下基础。研究中观察到慢病毒载体的转染效率高(超过 80%),能有效敲减 VEGF-C 表达,如果能解决靶向性问题,将具有广阔的临床应用前景。

参考文献:

[1] Guo B, Zhang Y, Luo G, et al. Lentivirus-mediated small interfering RNA targeting VEGF-C inhibited tumor lymphangiogenesis and growth in breast carcinoma[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009, 292(5): 633-639.

[2] Joory KD, Levick JR, Mortimer PS, et al. Vascular endothelial

growth factor-C (VEGF-C) expression in normal human tissues[J]. *Lymphat Res Biol*, 2006, 4(2): 73-82.

[3] Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 66(2): 159-164.

[4] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91(2): 125-132.

[5] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up[J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(4): 309-314.

[6] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Nitric oxide in breast cancer; induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4): 1201-1207.

[7] Mylona E, Alexandrou P, Mpakali A, et al. Clinicopathological and prognostic significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D and VEGF receptor 3 in invasive breast carcinoma[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2007, 33(3): 294-300.

[8] Xu T, Chen D. Serum vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor level in patients with colorectal carcinoma and clinical significance[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2006, 26(3): 329-331, 355.

[9] Kimura H, Kato H, Tanaka N, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) level predicts recurrence in patients with esophageal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(1A): 165-169.

[10] Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 103(4): 724-730.

[11] Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, et al. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(7): 387-395.

[12] Timoshenko AV, Chakraborty C, Wagner GF, et al. COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(8): 1154-1163.

[13] Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis-impact on cancer metastasis[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(4): 691-696.

[编辑:安 凤;校对:周永红]