

# RNAi 抑制胰腺癌细胞株 VEGF 表达的实验研究

赵 鑫<sup>1</sup>, 李德春<sup>1</sup>, 张子祥<sup>1</sup>, 赵 华<sup>1</sup>, 岑建农<sup>2</sup>

关键词: RNA 干扰; Panc-1; VEGF; PCR; ELISA

中图分类号: R394.3; Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)08-0636-03

## 0 引言

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是体内一种内皮细胞特有的有丝分裂原,调控血管内皮细胞的增殖、迁移、水解基膜和血管构建,诱发血管期的启动<sup>[1,2]</sup>。RNA 干扰(RNAi)是一种重要的转录后基因沉默机制<sup>[3]</sup>。本实验拟构建以 VEGF 基因为靶向的 RNA 干扰质粒,沉默胰腺癌 Panc-1 细胞株中 VEGF 基因的表达,为抑制胰腺癌血管生成提供基础。

## 1 材料与方 法

1.1 主要材料 siRNA 真核表达载体 p GCsi-U6/Neo/ GFP 和阴性对照载体购自上海吉凯基因化学公司,abl、VEGF 基因 PCR 引物及探针由上海生工公司合成;人 VEGF ELISA 试剂盒为美国 R & D 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 p GCsi-VEGF 的构建与细胞转染 参考 siRNA 的设计策略,从 VEGF 基因第三外显子上挑

选长为 19 个碱基的特异性寡核苷酸序列(5'-GGA GTACCTGA TGA GA TC-3'),合成其发卡样两端配对 siRNA 寡核苷酸链,中间以 9 个脱氧核苷酸的 Loop 相连。

取合成两条 shRNA 的模板单链,退火形成 siRNA 载体插入片断,见图 1。取空质粒用 BamHI 和 HindIII 行双酶切,电泳,切胶,回收线性质粒,纯化。将上述片断接入线性化质粒,得到重组子命名为 p GCsi-VEGF。对其进行测序。脂质体法将 p GCsi-VEGF 和阴性对照质粒转染 Panc-1 细胞。转染后的细胞用含 G418 培养液筛选 2 周后挑取阳性单克隆继续培养 4 周,用流式细胞仪检测筛选后的 GFP 表达率。

1.2.2 Real Time PCR 和 ELISA 取转染阳性克隆细胞,提取细胞内总 RNA,逆转录合成 cDNA 链。以看家基因 abl 的表达作为内参,abl 和 VEGF 的引物及 Taqman 探针序列如下:

Abl 引物:	正义	5'-TCCTCCA GCTGTTA TCTGGAA GA-3';
	反义	5'-ACTCA GACCCTGAGGCTCAAA G-3';
abl Taqman 探针:		5'-FAM-AA GCCCTTCA GCGCCA GTA GCA T-TAMARA-3'
VEGF 引物:	正义	5'-GGGCTCC GAAACCA TGA ACTT-3';
	反义	5'-CGCA TCA GGGGCACACA G-3';
VEGF Taqman 探针:		5'-FAM-CACCA TGCA GA TTA TGCGGA TCAAACC-TAMARA-3'

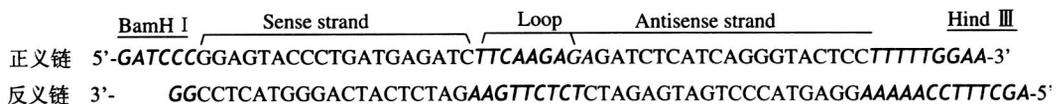


图 1 siRNA 载体插入片断序列

扩增条件:95 5 min,95 20 s,60 1 min,采集荧光信号,50 个循环。对样本设复管检测,取平均值作为目的基因表达水平。abl、VEGF 基因拷贝数按照江苏省血研所已建立的方法计算,以同一份样本 VEGF 基因拷贝数 ×10<sup>2</sup>/abl 基因拷贝数来计算 VEGF 基因表达水平,将未转染 Panc-1 细胞(对照)设定为 100%,计算出各组干扰效率。按照

收稿日期:2006-08-05;修回日期:2006-12-12  
 基金项目:卫生部科学研究基金资助项目(WKJ2004-2-011)  
 作者单位:1. 215006 江苏省苏州大学附属第一医院普外科;2. 江苏省血液研究所  
 通讯作者:李德春, E-mail: S23404DCL@sina.com  
 作者简介:赵鑫(1980-),男,硕士,住院医师,主要从事胰腺肿瘤的研究

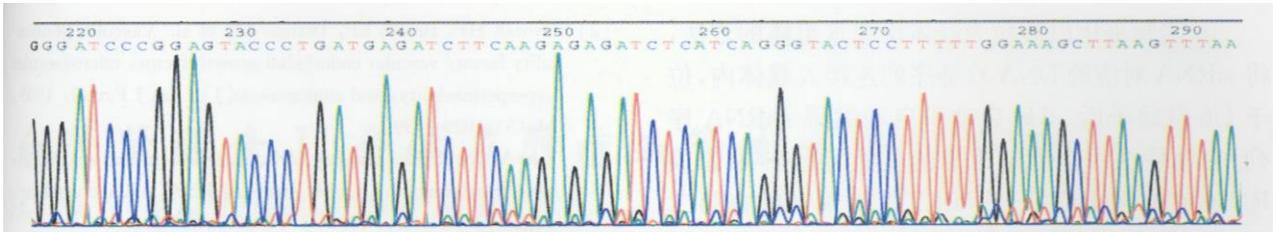


图 2 重组质粒的测序鉴定

第 219 ~ 280 位碱基为插入片段序列,其中第 225 ~ 271 位碱基为 siRNA 目的片段序列

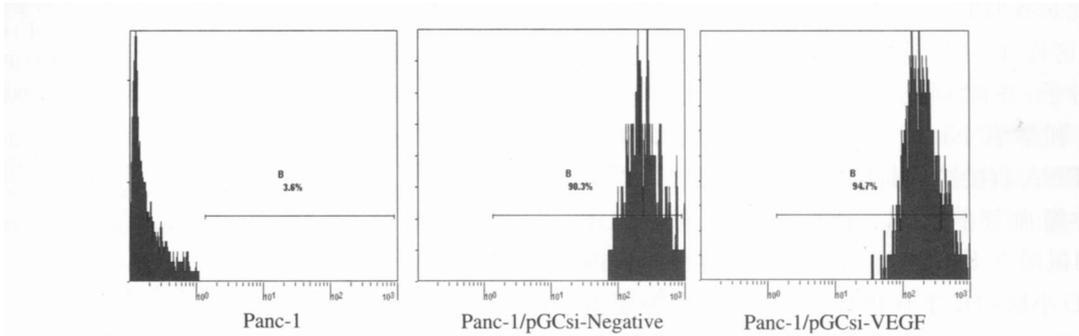


图 3 流式细胞仪检测 GFP 表达率

ELISA 试剂盒操作说明,450 nm 可见光比色得吸光度(A)值,作为纵坐标,标准品浓度(pg/ml)为横坐标,绘制标准曲线,根据标本的 A 值得出上清液 VEGF 浓度。将未转染 Panc-1 细胞(对照)设定为 100%,计算出各组相对含量。

1.2.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,两均数比较的 t 检验,以  $P < 0.05$  为具有统计学差异。

## 2 结果

2.1 重组质粒测序表明目的片段已克隆入载体,表示质粒构建成功。截取部分测序结果见图 2。

2.2 转染阳性克隆细胞 GFP 表达率 G418 筛选 2 周后挑取转染阳性单克隆细胞培养 4 周,Panc-1/阴性对照载体和 Panc-1/重组子的 GFP 表达率分别为 90.3%、94.7%,见图 3。

2.3 Real Time PCR 和 ELISA 结果 图 4 显示 VEGF 基因实时定量 PCR 检测标准曲线,不同实验间误差  $< 5\%$ 。Real Time PCR 和 ELISA 数据见表 1。

表 1 实时定量 PCR 检测各组的 VEGF 干扰效率及 ELISA 检测 VEGF 表达相对含量

标本	VEGF 基因相对含量 (VEGF 基因拷贝数 $\times 10^2$ / abl 基因拷贝数)	干扰效率 (%)	VEGF 蛋白表达 相对含量(%)
Panc-1	452.60 $\pm$ 6.15	0.00	100
Negative	446.72 $\pm$ 5.38	1.03	97 $\pm$ 4.53
pGCsi-VEGF	109.24 $\pm$ 5.87	75.86	37.08 $\pm$ 6.24

注:表示与 Panc-1 组比较差异具有统计学意义,  $P < 0.01$ ; 表示与 Negative 组比较差异具有统计学意义,  $P < 0.01$

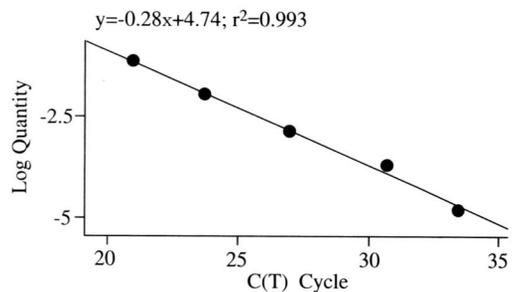


图 4 VEGF 基因实时定量 PCR 检测标准曲线

## 3 讨论

肿瘤血管生成对实体瘤的生长起重要作用,血管内皮生长因子(VEGF)是一种重要的促血管生成因子,通过促进血管内皮细胞的分裂和增殖,增加血管通透性,对肿瘤的发展、转移等发挥着重要作用。因此,有效地抑制 VEGF 的表达或降低其生物学活性是肿瘤抗血管生成治疗的关键。此前研究较多的有抗 VEGF 及 VEGFR 的单克隆抗体<sup>[5]</sup>,VEGF 片段反义寡核苷酸技术<sup>[6]</sup>等。近年来兴起的 RNA 干扰技术,为肿瘤的治疗开辟了新的途径<sup>[7]</sup>。目前有化学合成法、体外转录法等多种合成 siRNA 的方法。这些体外得到 siRNA 后再导入细胞内的方法的主要缺点是:siRNA 进入细胞前后容易被培养液或细胞内液中的 RNA 酶所降解。以质粒或病毒为载体介导的 siRNA 细胞内表达可以克服上述缺陷。Matsumoto 等<sup>[8]</sup>学者将带有荧光标记的 VEGF siRNA 质粒表达系统注射鳞癌细胞 NRS-1 的荷瘤小鼠,荧光显微镜观察发现十天后瘤周仍有荧光存在,而此时小片段的 siRNA 早已经消失了。

本实验采用以质粒为载体构建重组体的方法,将 siRNA 对应的 DNA 双链序列连接入载体内,位于 U6 启动子后。U6 启动子启动编码 shRNA 序列,它总是在一个固定距离的位置开始转录合成 RNA,它的终止信号为 TTTTT,转录产物在第二个 T 后切开,Pol I 遇到终止信号时可准确终止转录。U6 启动子对于小于 400 bp 的序列可有效稳定转录,因此是我们的 50~80 bp RNA 茎环的理想启动子<sup>[9]</sup>。这样重组体就能在细胞内表达特异的 shRNA 分子,并被 Dicer 酶加工后形成 siRNA 分子。意大利学者 Niola 等<sup>[10]</sup>将以质粒为载体的 VEGF siRNA 直接注射荷瘤的 SCID 小鼠,可以明显抑制肿瘤血管的生成。他们又将含有 VEGF siRNA 和鼠源性 IL-4 序列的逆转录病毒载体瘤内注射 SCID 小鼠的皮下移植瘤,肿瘤血管和肿瘤本身生长都受到明显抑制。本实验成功构建了 VEGF 基因靶向 RNAi 真核表达载体,并能有效抑制胰腺癌 Panc-1 细胞 VEGF 的表达,为进一步研究胰腺癌血管生成抑制奠定了基础。近来,Mulkeen 等<sup>[11]</sup>发现结肠癌 RKO 细胞表达 VEGF 受体,在体外实验中将 VEGF siRNA 转染该细胞后,VEGF 的表达下降了 95%,同时结肠癌细胞本身的增殖也下降了 67%,这就提示恶性肿瘤存在 VEGF 的自分泌环,本实验通过 RNA 干扰技术抑制 VEGF 的表达也为胰腺癌的基因治疗提供了新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, et al. Expression of vascular permeability factor vascular endothelial growth factor by human granulose and the calutein cells[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(1):157-165.
- [2] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(5):1029-1039.
- [3] 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.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京:科学出版社,2002. 96-99.
- [5] Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(18):5117-5124.
- [6] Im SA, Kin JS, Gomez Manzano C, et al. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(9):1252-1257.
- [7] Fraser A. RNA interference: human genes hit the big screen [J]. *Nature*, 2004, 428(6981):375-378.
- [8] Matsumoto G, Kushibiki T, Kinoshita Y, et al. Cationized gelatin delivery of a plasmid DNA expressing small interference RNA for VEGF inhibits murine squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(4):313-321.
- [9] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells [J]. *Nature Biotech*, 2002, 20(5):497-500.
- [10] Niola F, Evangelisti C, Campagnolo L, et al. A plasmid-encoded VEGF siRNA reduces glioblastoma angiogenesis and its combination with interleukin-4 blocks tumor growth in a xenograft mouse model [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(2):174-179.
- [11] Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, et al. Short Interfering RNA Mediated Gene Silencing of Vascular Endothelial Growth Factor: Effects on Cellular Proliferation in Colon Cancer Cells [J]. *Arch Surg*, 2006, 141(4):367-374.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]

## · 简讯 ·

### 《腹部外科》杂志征订启事

《腹部外科》杂志是中华医学会武汉分会主办、著名外科专家裘法祖院士创办、陈孝平教授主编的一本外科专业刊物。本刊为国内外公开发行的杂志,在国内外具有一定的影响。主要栏目有述评、专家笔谈、专题讨论、临床实践、技术改进、讲座、综述、基层经验、医学继续教育等。本刊经过多项学术指标综合评价和多位同行专家评议推荐,从 2003 年起被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。本刊已为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《万方数据资源系统(ChinaInfo)数字化期刊群》全文收录。

本刊为双月刊,64 页。每册定价 6.50 元。邮发代号:38-157。刊号:ISSN1003-5591 CN42-1252/R。

欢迎赐稿,欢迎订阅。

联系地址:武汉市汉口胜利街 155 号 邮政编码:430014 电话:(027)82789737 E-mail:fubuwaik@tom.com & fubuwaik@163.com