文章编号:1000-5404(2005)11-1089-04

论著

RNAi抑制大肠癌HCT116细胞株VEGF-mRNA表达的实验研究

吕 伟[1],郝 嘉[2],郝迎学[1],张 超[1] (第三军医大学:[1]西南医院普通外科,重庆 400038,[2]新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究载体介导的RNAi(RNA interference)技术对大肠癌细胞株HCT116中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA表达的抑制作用。**方法** 依据Tuschl等设计siRNA的原则,以VEGF为靶基因设计并合成有小发夹结构的两条DNA序列,经退火成互补双链,再克隆到载体Pavu6+27中构建重组体(Pavu6+27-VEGF siRNA)。DOTAP脂质体法转染重组体至大肠癌HCT116细胞株,经G418筛选,以空质粒(Pavu6+27)转染为对照;半定量RT-PCR法观察HCT116细胞中VEGF-mRNA表达改变。**结果** ①成功构建发卡样VEGF siRNA(small interfere RNA)真核表达载体(Pavu6+27-VEGF siRNA);② Pavu6+27-VEGF siRNA转染HCT116细胞后,VEGF-mRNA表达较空载体Pavu6+27转染的对照组显著下降。**结论** 成功构建载体介导的VEGF靶向RNA干扰重组体,并能有效抑制HCT116细胞中VEGF-mRNA表达,为下一步利用RNAi技术抑制肿瘤血管形成以及局部侵袭和远处转移提供研究基础。

关键词:RNA干扰;HCT116;VEGF
中图法分类号:R394-33;R394.2;R735.34 **文献标识码**:A

Inhibition effects of RNAi on VEGF-mRNA expression in HCT116 cells

LU Wei[1], HAO Jia[2], HAO Ying-xue[1], ZHANG Chao[1] ([1]Department of General Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Cardiac Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of RNAi on VEGF-mRNA expression in HCT116 cells. **Methods** The Pavu6+27-VEGF siRNA expression vector was constructed by gene recombination, then transfected into the cultured HCT116 cells by DOTAP method. The positive cell clones were screened with G418. The stable transfection and expression of VEGF-mRNA in HCT116 were determined by semi-quantitative RT-PCR. The Pavu6+27 transfected plasmid was used as control. **Results** Pavu6+27-VEGF siRNA expression vector was successfully constructed. DOTAP-mediated gene transfection of Pavu6+27-VEGF siRNA expression vector into HCT116 cells down-regulated the mRNA expression level of VEGF gene, as compared with the control group. **Conclusion** The Pavu6+27-VEGF siRNA expression vector can inhibit the expression of VEGF-mRNA in HCT116 cells, which may be beneficial in searching new gene therapy of the tumors.

Key words: RNA interference; HCT116; VEGF

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是体内一种强效力的促血管生成因子,能直接或间接参与血管生成,在恶性肿瘤的发生、发展及预后中具有极其重要的地位[1]。近年来,抗VEGF已成为肿瘤抗血管治疗的热点。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指由双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因沉默机制,RNAi能够高效特异地沉默同源基因的表达。1998年RNA干扰的发现[2],特别是在哺乳动物细胞应用小干扰RNA(small interfering, siRNA)成功介导RNAi[3],为基因功能的研究提供了强大的武器,也为肿瘤基因治疗增添了新的活力。

基于上述理论本实验拟构建以VEGF基因为靶向的RNA干扰重组体,通过RNAi技术沉默大肠癌细胞株HCT116中VEGF基因的表达,为下一步利用RNAi技术抑制肿瘤血管形成以及局部侵袭和远处转移提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达载体为质粒Pavu6+27(由美国Michigan大学生物化学系David Engelke博士惠赠),克隆用大肠杆菌Jm109(由第三军医大学中心实验室保存),HCT116细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、

作者简介:吕 伟(1972-),男,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方面的研究。电话:(023)66935425
通讯作者:张 超,电话:(023)68765274,E-mail:zhangchao@163.com.cn
收稿日期:2004-12-19;修回日期:2005-03-21

Xba Ⅰ、*Bam*H Ⅰ，T4 DNA 连接酶，RT-PCR 试剂盒均为大连 TaKara 生物公司产品；DL2000 核酸分子量标准、柱离心式质粒抽提试剂盒、柱离心式胶回收试剂盒均购自美国 Promega 公司；DOTAP 脂质体转染试剂、RNA 提取试剂 Tripure、DEPC 购自美国 Roche 公司；DMEM 高糖培养基、标准小牛血清购自美国 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 发卡样 VEGF 基因 siRNA 的设计与合成 根据 GenBank 中报道的 VEGF 的核苷酸序列(Gene ID 7422)，参考 siRAN 的设计策略，通过基因 Blast，挑选长为 19 个碱基的特异性寡核苷酸序列(5′-GGAGTACCCTGATGAGATC-3′)，合成其发卡样两端配对 siRNA 寡核苷酸链，同时合成互补链，分别在 5′和 3′端引入 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切位点(由上海生工公司合成)。

正义链：5′-TCGACGGAGTACCCTGATGAGATCAAGCGATCTCATCAGGGTACTCCTTTTTT-3′；反义链：5′-CTAGAAAAAAGGAGTACCCTGATGAGATCGCTTGATCTCATCAGGGTACTCCG-3′。

1.2.2 Pavu6 + 27-VEGF siRNA 的构建

1.2.2.1 技术路线 见图 1。

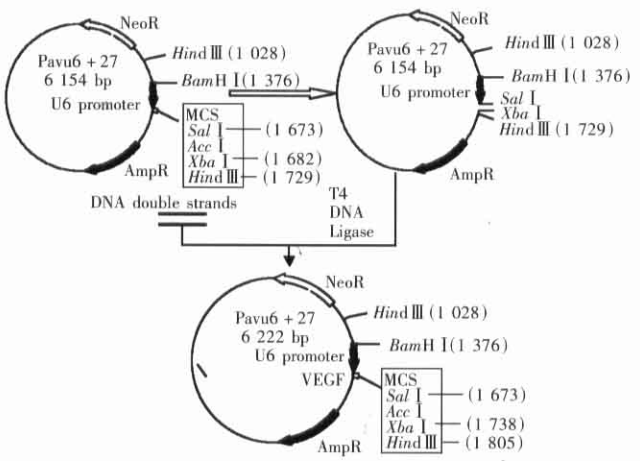


图 1 构建重组表达载体技术路线图

Fig 1 The technological chart for construction of the Pavu6 + 27-VEGF siRNA expression vector

1.2.2.2 退火 用退火缓冲溶液溶解 DNA 单链片断，退火体系：两条寡核苷酸片断各 2 μl(1 μg/μl)，1 × 退火 buffer 46 μl。退火反应：95 ℃ 5 min，70 ℃ 10 min，缓慢降至 30 ℃，维持 30 min，缓慢降至 4 ℃后，－20 ℃保存，临用前稀释 10 倍。

1.2.2.3 酶切 载体质粒 Pavu6 + 27，10 μg，*Sal* Ⅰ 5 μl，*Xba* Ⅰ 5 μl，10 × T Buffer 15 μl，三蒸水补足 100 μl，37 ℃水浴 6 h。

1.2.2.4 切胶回收线性化空载体 灌制 1% 琼脂糖凝胶，点样酶切产物，60 V 电压电泳 3 h，紫外灯下切下含目的 DNA 片断的凝胶。按凝胶 DNA 回收试剂盒说明书操作回收。

1.2.2.5 连接 取 1 μl 线性化载体，与 1 μl 插入片段，摩尔数之比约 1∶3，10 × T4 连接酶 buffer 2 μl，T4 连接酶 1 μl，三蒸水补足 20 μl，16 ℃连接过夜。

1.2.2.6 转化与阳性克隆质粒的挑选 采用氯化钙法[4]，将重组质粒和空质粒分别转入大肠杆菌 Jm109 中。利用含氨苄青霉素(80 mg/L)的 LB 固体培养基平板筛选阳性克隆质粒。挑取单菌落结种 LB 液体培养基，使用 Promega 公司质粒提取试剂盒提取可能的菌落质粒。

1.2.2.7 重组质粒酶切鉴定 将重组质粒和空质粒分别取 10 μl，10 × K buffer 5 μl、*Hind*Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ限制性内切核酸酶各 1 μl，无核酶三蒸水补足 50 μl，37 ℃双酶切 6 h。酶切产物 10 μl，2% 琼脂糖电泳。

1.2.2.8 重组质粒测序鉴定 将细菌培养扩增，0.8 ml 过夜培养细菌(摇至对数晚期)加无菌甘油 0.2 ml，送大连 Takara 公司检测核苷酸序列，阳性克隆命名为 Pavu6 + 27-VEGF siRNA。

1.2.3 阳性克隆转染与含阳性克隆细胞的筛选 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 1 d，换取新鲜培养液(含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液，37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养)后调整浓度为 2×10^5/ml，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 2 d，弃去原培养液，用含 G418 300 μg/ml 的 DMEM 培养液进行筛选，1 周后收集 G418 抗性细胞。转染了 Pavu6 + 27-VEGF siRNA 的 HCT116 细胞简写成 Pavu6 + 27-VEGF siRNA HCT116 细胞。转染空质粒的 Pavu6 + 27 的 HCT116 细胞简写成 Pavu6 + 27 HCT116 作为对照，操作步骤同前。

1.2.4 半定量 RT-PCR 法检 Pavu6 + 27-VEGF siRNA HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达改变，以 Pavu6 + 27 HCT116 为对照。收集培养的 2 种细胞分为 4 组，按 Tripure 操作说明，分别提取总 RNA，紫外分光光度计定量，调整浓度为：1 g/L。取 2 μl total RNA 与 1 μl oligo (dT) 70 ℃ 5 min，置于冰浴 5 min，加 2 μl 10 mmol/L dNTP mix，5 μl 5 × Buffer，1 μl MMLV 反转录酶，1 μl RNAsin，去离子水补至 25 μl。42 ℃ 60 min，－20 ℃冻存。PCR 反应体系为：2 μl 反转录产物(模板)，两对引物各 1 μl(选用看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GA PDH 基因作为内参照，GAPDH 上游引物的序列为 5′-AATTCAACGGCACAGTCAAGG C-3′，下游引物的序列为 5′-GGATGCAGGGATGATGTTCTGG-3′，扩增片段为 467 bp。VEGF 上游引物序列为：5′-GGAGTACCCTGATGAGATCGAGT-3′，下游引物的序列为：5′-GTCACATCTGCAATGACGTTCG-3′，扩增片断长度 648 bp，引物序列设计合成均由大连 Takara 公司完成)。2.5 μl 10 × Buffer，2 μl 25 mmol/L $MgCl_2$，2 μl 10 mmol/L dNTP mix，0.5 μl *Taq* 酶，去离子水补至 25 μl。反应条件为：预变性 94 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min，60 ℃ 50 s，72 ℃ 1 min 共 30 个循环；72 ℃延伸 10 min。取 10 μl 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳，对照分子量标准检测扩增结果，Gel-Doc 2000 型凝胶成像分析系统对目的 DNA 条带进扫描，用 Image-glub 4.0 分析软件测得电泳图谱上每条基因条带的光密度值。计算各个样本 VEGF 强度与 GAPDH 内对照强度的比值，从而反映 VEGF 表达的变化。

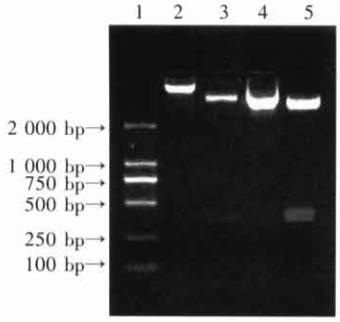
1.2.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定

Pavu6 + 27-VEGF 重组子经 *Hind*Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ双酶切后呈 3

条带，分别为 6.2×10^3 的载体片段、338 bp 和 422 bp 的小片段。空载体双酶切后出现两条带，6.2×10^3 的载体片段，338 bp 和 353 bp 不能分开融为 1 条带(图 2)。



1: Marker; 2: Pavu6 + 27; 3: Pavu6 + 27/*Hin*dⅢ + *Bam*HⅠ; 4: Pavu6 + 27-VEGF; 5: Pavu6 + 27-VEGF/*Hin*dⅢ + *Bam*HⅠ

图 2　重组质粒双酶切鉴定

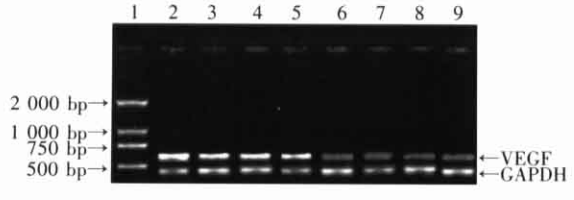
Fig 2　Identification of recombinant plasmid Pavu6 + 27-VEGF after restriction

2.2　重组质粒测序鉴定

将重组质粒 Pavu6 + 27-VEGF 送大连 Takara 公司测序(测序号 CQS1384)，引物序列根据 Pavu6 + 27 载体序列，采用 Primer-Premier 5.0 设计为：5′-CCCAAGCTTGGATCCAAGGTCGGGC-3′。结果表明 siRNA 表达模板成功构建于 Pavu6 + 27 载体上，序列完全正确(282 ~ 334)，与目的序列相同。

2.3　半定量 RT-PCR 结果

VEGF 和 GAPDH 引物的扩增基因片段经电泳和 EB 染色后，结果显示扩增片段大小与所设计的大小完全一致，分别为 648 bp 和 467 bp。为电泳染色后结果，其中左侧为对照，右侧为实验组。可见，重组体 Pavu6 + 27-VEGF siRNA 转染的 HCT116 中 VEGF-mRNA 的表达较空载体 Pavu6 + 27 转染的 HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达量显著下降(图 3)。统计分析结果表明，重组体 Pavu6 + 27-VEGF siRNA 转染的 HCT116 中 VEGF-mRNA 的表达较空载体 Pavu6 + 27 转染的 HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达量显著下降。VEGF 扩增产物的强度与内对照 GAPDH 的比值在对照组和实验组分别为(0.986 ± 0.032)和(0.624 ± 0.084)($P<0.01$，$n=4$)。实验组约降低为对照组的 61.2%。



1,2,3,4: Control group, expression of VEGF-mRNA in HCT116 be transfected with Pavu6 + 27; 5, 6, 7, 8: Experimental group, expression of VEGF-mRNA in HCT116 be transfected with Pavu6 + 27-VEGF

图 3　空质粒及重组质粒转染前后 HCT116 中 VEGF-mRNA 的表达的变化

Fig 3　Expression of VEGF-mRNA in HCT116

3　讨论

肿瘤的生长、侵袭及转移过程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尤其是浸润、转移的重要因素。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。

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[5]，反义寡核苷酸基因干涉[6]，VEGF 片段[7]等，但效果不甚理想。近几年来兴起的 RNA 干扰技术，为肿瘤的分子生物治疗开辟了新的途径[8]。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、短周期，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。目前有多种合成 siRNA 分子方法[9]，如化学合成法、体外转录法、“鸡尾酒”法，这些体外得到 siRNA 后再导入细胞内的方法有两方面无法克服的缺点：siRNA 进入细胞后容易被降解；进入细胞 siRNA 的数量不受控制。针对这种情况，出现了质粒、病毒类载体介导的 siRNA 体内表达。本实验即采用以质粒为载体构建重组体的方法，该方法的基本思路是：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，本实验中转染 1 周后重组体能保持较高的沉默效率。目前基因转染有脂质体法、磷酸钙沉淀法、电穿孔法等，我们选择了 Roche 公司的 DOTAP 脂质体转染试剂，该试剂的优点是：转染效率高、细胞损伤小，可在含血清的培养基中进行转染。本实验按说明书方法进行操作转染获得成功。

本实验成功构建了 VEGF 靶向 RNA 干扰重组体，并能有效抑制 HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达，为进一步研究利用 RNAi 技术抑制肿瘤血管形成以及局部侵袭和远处转移奠定了基础，为肿瘤分子生物治疗提供了新的思路。

参考文献：

[1] Hanrahan V, Currie M J, Gunningham S P, *et al*. The angiogenic switch

for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression[J]. J Pathol, 2003, 200(2): 183-194.

[2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Natrue, 1998, 391(6669): 806-811.

[3] Elbashir S M, 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.

[4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002. 96-99.

[5] Brekken R A, Overholser J P, Stastny V A, *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 S A, Kin J S, 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] Jia H, Jezequel S, Lohr M, *et al*. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283(1): 164-173.

[8] Fraser A. RNA interference: human genes hit the big screen[J]. Nature, 2004, 428(6981): 375-378.

[9] Shen W G. RNA interference and its current application in mammals[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(7): 1084-1091.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)11-1092-01

肝硬化脐静脉开放的临床意义

Clinical significance of umbilical vein patefaction in cirrhosis patients

李向红,龙庆林 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

肝硬化门脉高压的一个重要特点是侧枝循环形成,其中最重要的一条侧枝循环是冠状静脉-胃-食道的侧枝通路。此外也可通过其它路径进入体循环,若门静脉血流一部分流入出生后已闭锁的脐静脉或副脐静脉,使其重新开放,但脐静脉开放的临床意义并不清楚。本研究收集我院1994年1月到2004年12月收治的脐静脉开放患者58例,对其临床特点进行分析,以探讨肝硬化脐静脉开放的临床意义。

1 临床资料

1.1 病例选择

我院1994年1月到2004年12月收治872例行彩色多普勒检查的肝硬化患者,其中肝炎后肝硬化825例、酒精性肝硬化47例。其中58例经彩色多普勒检查发现有脐静脉开放。随机选择脐静脉未开放的肝硬化58例做为对照组。常规方法检查肝功,胃镜观察食道静脉曲张。比较脐静脉开放组及未开放组的临床体征、肝功能及并发症。

1.2 统计学处理

采用 χ^2 检验。

2 结果

872例肝硬化患者中发现脐静脉开放患者58例,占6.7%,超声多普勒检查提示脐静脉开放,内径0.18~4.3 cm,平均(0.77±0.69)cm,均为肝炎后肝硬化,其中男性48例,女性10例,年龄31~68(46.3±12.7)岁。对照组58例中男性47例,女性11例,年龄(45.8±11.9)岁。脐静脉开放组与对照组比较其腹水征、上消化道出血、肝昏迷发生率和肝功能改变均无明显差异($P>0.05$);开放组27例行胃镜检查,其中25例存在不同程度的食道静脉曲张,食道静脉曲张率为92.6%(25/27);脐静脉未开放组38例行胃镜检查,其中33例存在不同程度的食道静脉曲张,食道静脉曲张率为86.8%(33/38),两组相比无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

正常肝血供70%~80%来自门静脉,门静脉高压时经门静脉至肝的循环可减至正常的13%,门静脉高压时门-体静脉系统间形成侧支循环交通通道,其中部分患者脐静脉开放与胸壁、腹壁静脉交通在腹壁形成"水母征"。肝硬变脐静脉开放发生率各家报道不一致,Morin等[1]报道占门脉高压患者的15.6%,国内汤治民等[2]用超声检查123例肝硬化患者,脐静脉开放发生率高达39.02%,陈宇等[3]报道肝硬化脐静脉开放发生率为14%。一般报道占肝硬化的6%~30%。本组872例肝硬化患者中发现脐静脉开放患者58例,占6.7%,与文献报道的相近。

一般认为超声多普勒检查是诊断脐静脉开放最准确有效的方法,其诊断脐静脉开放敏感性和特异性分别高达82%和100%[4,5]。本组58例脐静脉开放患者均由超声多普勒检查发现。另外,利用X线造影,将造影剂注入脐静脉或门静脉行静脉造影检查也是诊断脐静脉开放一种有效手段,但受一定局限,

(下转1096页)

作者简介:李向红(1970-),女,湖南省岳阳县人,主管护师,主要从事消化内镜诊治方面的研究。电话:(023)68754678

收稿日期:2005-03-10;修回日期:2005-04-12