文章编号:1000-5404(2009)13-1305-04

论著

VEGF 特异 siRNA 重组腺病毒构建及其对 K562 细胞增殖的抑制作用

李方方, 徐酉华, 罗 庆 (重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014)

摘 要: 目的 构建重组腺病毒 Ad5-VEGFsi 观察其抑制人红白血病 K562 细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达及其对 K562 细胞增殖抑制作用的影响。**方法** ①合成针对人 VEGF mRNA 的特异性 siRNA;将其插入穿梭质粒 pSES-HUS,命名为 pSES-VEGFsi;后者与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-l 同源重组。酶切鉴定成功后,于 HEK293 细胞中包装、扩增,氯化铯超速梯度离心后得到滴度较高的重组腺病毒 Ad5-VEGFsi;②Ad5-VEGFsi 以最适感染复数(multiplicity of infection,MOI)感染 K562 细胞 72 h 后,RT-PCR 及 ELISA 方法检测 VEGF mRNA 及细胞培养液上清 VEGF 蛋白表达、MTT 法检测细胞增殖、流式细胞仪测定细胞凋亡率。**结果** 成功构建重组腺病毒 Ad5-VEGFsi,氯化铯梯度离心纯化获得重组腺病毒滴度约 4.6×10^{11} pfu/ml; Ad5-VEGFsi 感染 K562 细胞 72 h 后,VEGF mRNA 水平与对照组相比下降了 66.55%($P<0.01$),蛋白浓度下降了 86.03%($P<0.01$)。感染 Ad5-VEGFsi 后 K562 细胞生长明显受到抑制,且细胞的凋亡率也较对照组增加了 13.89%($P<0.01$)。**结论** 重组腺病毒腺 Ad5-VEGFsi 可明显抑制人白血病 K562 细胞 VEGF 的表达,从而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。

关键词: RNA 干扰;细胞增殖;血管内皮生长因子(VEGF)
中图法分类号: R394.3; R730.23; R733.7 **文献标识码**: A

Construction of recombinant adenovirus vector encoding VEGF siRNA and its inhibitory effect on K562 cell proliferation

LI Fang-fang, XU You-hua, LUO Qing (Department of Hematology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To construct an recombinant adenovirus vector of vascular endothelial growth factor small interfering RNA(Ad5-VEGFsi) and to observe its inhibitory effect on the cell proliferation of human leukemia K562 cells. Methods The specific human VEGF siRNA was subcloned into the shuttle plasmid pSES-HUS and then cotransfected with plasmid pAdeasy-1 to produce pAd5-VEGFsi by homologous recombination. The identified recombinant plasmid pAd5-VEGFsi was packaged and amplified in 293 cells. At 72 h after the transfection of Ad5-VEGFsi into K562 cells, VEGF mRNA expression and the protein level of VEGF in the cell culture supernatant were determined by RT-PCR and ELISA, respectively. Cell proliferation was measured by MTT assay and cell apoptosis by flow cytometry. Results The recombinant adenovirus Ad5-VEGFsi was successfully constructed. Ad5-VEGFsi with the titer of 4.6×10^{11} pfu/ml was harvested by CsCl gradient purification. Compared with those in the control, EGF mRNA in cells decreased by 66.55% ($P<0.01$) but the VEGF protein concentration in the cell culture supernatant reduced by 86.03% ($P<0.01$). As a consequence, the cell growth was inhibited, but the cell apoptosis rate increased 13.89% as compared with those in the control ($P<0.01$). Conclusion Recombinant adenovirus Ad5-VEGFsi could effectively down-regulate VEGF expression in K562 cells, inhibit cell growth, and induce cell apoptosis.

Key words: RNA interference; cell proliferation; vascular endothelial growth factor

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)是一特异性作用于血管内皮细胞,促进内皮细胞分裂增殖、提高血管通透性的生长因子。近年的研究表明,VEGF 除了在实体肿瘤的发生、发展、侵润及转移过程中起重要作用外,在血液系统恶性肿瘤的发生、发展方面也起到重要作用。有报道表明[1,2]在急、慢性白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤等细胞中均高表达 VEGF,并不同程度表达 VEGF 受体,提

作者简介:李方方,女, 河北省邢台市人,硕士研究生,主要从事小儿血液与肿瘤方面的研究。电话:(023)63631890,E-mail: fangfanglv@163.com
通信作者:徐酉华,E-mail:xuyouhua0504@163.com
收稿日期:2008-08-16;修回日期:2008-11-17

示 VEGF 可通过自分泌和旁分泌两种途径促进血液肿瘤的发展。腺病毒由于其具有转染效率高,可转染细胞谱广及不整合宿主染色体等优点,现已成为基因治疗中应用最广泛的病毒载体之一。本研究拟应用腺病毒介导的 RNA 干扰技术构建携带靶向人 VEGF siRNA 的重组腺病毒,以此感染人白血病 K562 细胞,观察其所产生的 RNA 干扰效应及其对 K562 细胞增殖抑制的影响,探索白血病基因治疗新的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞及菌株 表达红色荧光蛋白(RFP)的腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS9(由本实验室罗庆老师惠赠),腺病毒基因组骨架质粒 pAdEasy-1(由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室 TONG-CHUAN HE 教授惠赠)。腺病毒包装细胞 HEK293、BJ5183 及 DH5α 菌株、人红白血病细胞系 K562 细胞由本实验室保存。

1.1.2 酶类及主要化学试剂 SfiI 限制性内切酶、T_4 连接酶、质粒 DNA 提取及纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司。PacI、PmeI 限制性内切酶为 NEB 公司产品、脂质体 Lipofectamine2000、Trizol reagent 总 RNA 提取试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品、逆转录试剂盒购自 TOYOBO 公司、RT-PCR 试剂盒为天根公司产品、人 ELISA 试剂盒为晶美公司产品、四甲基偶氮唑盐(MTT)、Annexin Ⅴ-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自凯基公司。DNA 测序委托重庆医科大学感染病实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 Ad5-VEGFsi 重组腺病毒的构建、包装及扩增 选择文献[3]中抑制 VEGF 效果较好的两个 siRNA 片段,插入经 SfiⅠ 酶切的腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS,得到 pSES-VEGFsi。转导入感受态细菌 DH5α,筛选阳性克隆,酶切鉴定成功后,送重庆医科大学感染病实验室测序分析。测序正确的 pSES-VEGFsi 质粒酶切线性化后,与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 同源重组。筛选阳性克隆,酶切鉴定正确后,命名为 pAd5-VEGFsi。再次转导入感受态 DH5α 大量扩增,用以转化 HEK293 包装细胞。pAd5-VEGFsi 酶切线性化后,脂质体介导转染 293 细胞进行包装,转染成功后 25 ~ 30 d,待大部分细胞漂起后收集细胞,重复冻溶 3 次,收集病毒上清感染准备好的 HEK293 细胞,使重组腺病毒大量扩增,乒乓交互感染扩增 3 轮后,氯化铯(CsCl)梯度超速离心纯化后,收获高滴度 Ad5-VEGFsi 腺病毒,-80℃保存待用。

1.2.2 Ad5-VEGFsi 病毒滴度的测定 以 5×10^5 个/孔接种 293 细胞于 6 孔板,待细胞密度约 80% 后,倍比稀释(1∶10^3 ~ 1∶10^{10})病毒上清分别感染细胞,48 h 后荧光显微镜下计算表达 RFP 荧光阳性的细胞数,测定 Ad5-VEGFsi 病毒滴度(pfu/ml)。

病毒滴度(pfu/ml) =(RFP 荧光阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数)/0.4

1.2.3 Ad5-VEGFsi 转染 K562 细胞 接种 K562 细胞于 6 孔培养板,以转染效率较高、细胞活性较强的感染复数(multiplicity of infection, MOI)(MOI = 100)感染细胞,分为实验组(K562/Ad5-VEGFsi 组)、空载体组(K562/Ad5 组)、对照组(K562 组)3 组。于感染后 72 h 收集各组细胞及培养液上清,检测 VEGF mRNA 及蛋白表达情况,实验重复 3 次。

1.2.3.1 RT-PCR 检测 K562 细胞 VEGF mRNA 水平

①细胞总 RNA 提取及 cDNA 合成:均参照试剂盒说明书操作。②RT-PCR:参照文献[4]合成引物。VEGF 上游引物:5′-AGT GGT CCC AGG CTG CAC-3′,下游引物:5′-TCC ATG AAC TTC ACC ACT TCG T-3′(扩增片段为 69 bp);GAPDH 为内参照,扩增片段为 113 bp。将 VEGF 和 GAPDH 两对引物放在一个反应体系中同时进行 PCR 反应,PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,66 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,扩增 30 个循环。扩增产物 4% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相分析,VEGF mRNA 的相对表达水平按 VEGF 与内参 GAPDH 灰度值的比值确定。

1.2.3.2 ELISA 法检测 K562 细胞培养液上清 VEGF 蛋白的浓度 按照人 VEGF ELISA 试剂盒说明书进行,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,求出标准曲线方程。通过标本的 A 值得出上清液中 VEGF 蛋白浓度。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖能力 取感染 Ad5-VEGFsi 的 K562 细胞,调整合适的细胞浓度,接种于 96 孔板(设 6 个复孔,实验重复 3 次)。分别培养 0、1、2、3、4、5 d,酶联免疫检测测定各孔吸光度值,以时间、吸光度绘制细胞增殖曲线。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 重组腺病毒 Ad5-VEGFsi 感染 K562 细胞 72 h 后,调整细胞浓度约为 1×10^6/ml,采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法,测定细胞凋亡率。

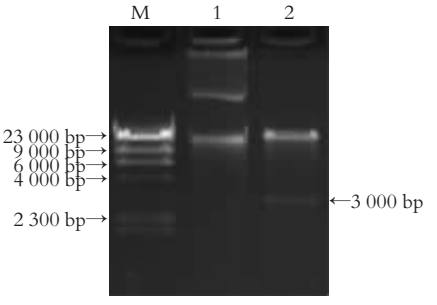
1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件处理进行方差分析。

2 结果

2.1 重组腺病毒 pAd5-VEGFsi 的鉴定、包装扩增及滴度测定

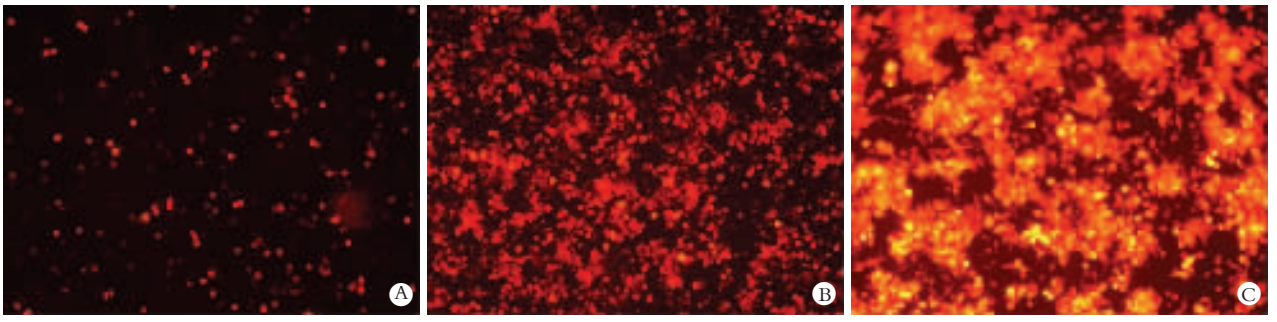
PacI 酶切 pAd5-VEGFsi 获得约 20 kb 的大片段和约 3.0 kb 的小片段(图 1)。酶切结果提示重组腺病毒 pAd5-VEGFsi 构建正确。



M:λ-*Hind*Ⅲ digest DNA 标准;1: pA5-VEGFsi; 2: pA5-VEGFsi/*Pac* Ⅰ

图 1 *Pac* Ⅰ 酶切鉴定 pAd5-VEGFsi 质粒

重组腺病毒 Ad5-VEGFsi 在 HEK293 细胞包装 24 h 后观察有红色荧光蛋白表达,且随着时间的延长细胞表达的红色荧光蛋白强度也逐渐增强(图 2)。CsCl 梯度超速离心纯化后测定 Ad5-VEGFsi 病毒滴度约为 4.6×10^{11} pfu/ml。

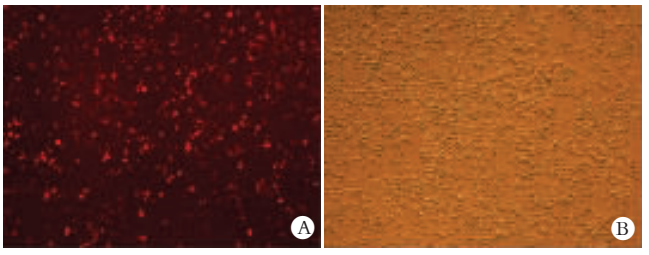


A：第 2 天；B：第 10 天；C：第 20 天

图 2　重组腺病毒感染 HEK293 包装细胞的荧光显微镜观察　（×100）

2.2　重组腺病毒感染 K562 细胞

由图 3 可见重组腺病毒 Ad5-VEGFsi 可有效感染 K562 细胞，且细胞生长状态较好。

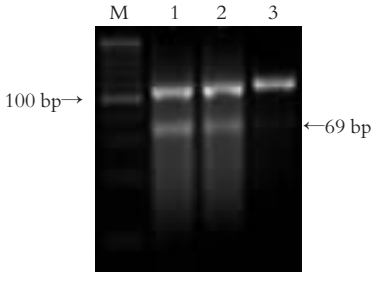


A：感染 72 h（荧光）；B：感染 72 h（平光）

图 3　重组腺病毒感染 K562 细胞的观察　（×100）

2.3　腺病毒 Ad5-VEGFsi 影响 K562 细胞 VEGF 的表达

2.3.1　RT-PCR 检测 VEGF mRNA 结果　　凝胶电泳结果显示，实验组 K562 细胞 VEGF mRNA 水平与对照组、空载体组相比显著下降，差异有统计学意义（P 值均 <0.01），而空载体组与对照组相比没有明显差异（$P>0.05$）（图 4）。



M：20 bp 标准；1：对照组（K562）；2：空载体组（K562/Ad5）；3：实验组（K562/Ad5-VEGFsi）

图 4　各组 K562 细胞 mRNA 表达情况

2.3.2　ELISA 检测 VEGF 蛋白浓度结果　　腺病毒感染 K562 细胞 72h 后，细胞上清液中 VEGF 含量与对照组比较，表达量显著减低（$F=52.391$，$P<0.01$）（表 1），表明重组腺病毒 Ad5-VEGFsi 可抑制 K562 细胞分泌 VEGF。

表 1　各组细胞培养上清中 VEGF 蛋白含量（pg/ml，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	VEGF 蛋白（pg/ml）
对照组	1 302.747 ± 28.029
空载体组	1 289.949 ± 27.849
实验组	1 120.742 ± 14.546[a]

a：$P<0.01$，与对照组及空载体组比较

2.4　MTT 法检测转染细胞的增殖

细胞生长曲线可见实验组细胞的生长较空载体组及对照组明显受抑制（$n=18$，$P<0.01$），这种抑制作用随时间延长而增加；而空载体组与对照组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。表明腺病毒 Ad5-VEGFsi 可抑制 K562 细胞增殖（图 5）。

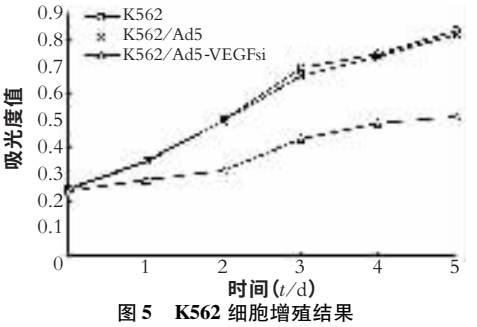
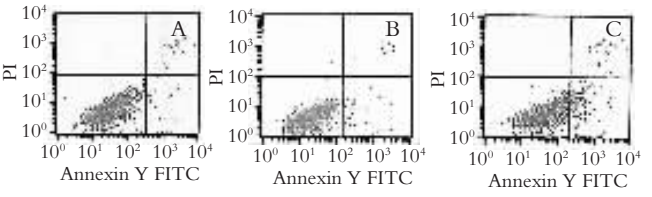


图 5　K562 细胞增殖结果

2.5　K562 细胞凋亡率的改变

重组腺病毒 Ad5-VEGFsi 作用 K562 细胞 72h 后细胞凋亡率为（16.45 ± 0.14）%。而空载体组及对照组分别是（3.54 ± 0.17）%、（2.56 ± 0.20）%。由此可见重组腺病毒 Ad5-VEGFsi 可促使白血病细胞发生凋亡，并高于空载体组及对照组（$n=3$，$P<0.01$）（图 6）。



A：对照组；B：空载体组；C：实验组

图 6　流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况

3　讨论

VEGF 是迄今鉴定出来的最重要的血管生成因子，是一种高度特异性的内皮细胞有丝分裂素，其在实体肿瘤中的作用已得到广泛肯定。近年来，有关 VEGF 在白血病过程中的作用机制已成为研究热点。Bellamy 等[1] 在 mRNA 和蛋白质两个水平检测了 12 种人类造血系统肿瘤细胞系中 VEGF 及其受体的表达。结果显示这些细胞系都有 VEGF mRNA 的表达和

蛋白的细胞外分泌,并且除多发性骨髓瘤8226细胞系外均有Fit-1(VEGF受体)的表达。Aguayo等[5]发现急、慢性白血病患者和骨髓增生异常综合征患者的VEGF表达显著升高。表明VEGF在血液系统肿瘤中的表达具有普遍性。

安全高效的基因载体是成功而有效的进行基因治疗的先决条件。在本实验中我们采用改良的Adeasy-1腺病毒载体系统表达VEGFsiRNA,延长小干扰RNA在体内的存在时间,提高转染效率,大大增强了体内实验的干扰效率,提高基因治疗的效果。

在本实验中,我们成功构建了含有针对VEGF特异性siRNA片段的重组腺病毒,即Ad5-VEGFsi。将其转染白血病K562细胞72 h后,RT-PCR和ELISA检测结果显示,实验组VEGF表达水平明显降低,细胞VEGF mRNA水平较对照组下降了66.55%,培养液上清VEGF蛋白浓度也相应降低了86.03%,而空载体Ad5组与对照组相比变化轻微。说明腺病毒Ad5-VEGFsi不仅可抑制人白血病K562细胞中VEGF基因的表达,还可以进一步抑制VEGF蛋白的表达。同时我们观察到将该载体感染K562细胞后,细胞生长明显受到抑制,且这种抑制作用随时间的延长而逐渐明显。此外,流式细胞仪检测结果显示,K562细胞的凋亡率较空载体组及对照组显著增加($P<0.01$),这与Ruan[6]、许文林等[7]研究结果相一致。由实验结果我们推测:K562细胞在正常情况下分泌的VEGF一方面可能经自分泌途径作用于肿瘤细胞表面的VEGF受体,促进白血病细胞的增殖;另一方面通过旁分泌途径作用于血管内皮细胞上VEGF受体,使内皮细胞分泌更多的细胞生长因子,促进白血病细胞的增殖。然而,关于VEGF抗凋亡的作用机制仍在进一步研究中,我们认为其抗凋亡机制可能是经自分泌途径,与白血病细胞上的受体结合,通过某种信号途径使一些原癌基因激活、抑癌基因失活,从而阻断凋亡途径实现的。

综上所述,腺病毒Ad5-VEGFsi可有效抑制K562细胞VEGF表达,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。因此,抑制VEGF表达可能成为血液肿瘤治疗的一项新措施。本研究也为进一步应用腺病毒介导RNAi技术开展对白血病的基因治疗奠定了基础。

参考文献:

[1] Bellamy W T, Richter L, Frutiger Y, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies [J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 728-733.

[2] 王 一, 肖志坚, 刘 澎, 等. 血管内皮细胞生长因子及其受体KDR、Flt1在急性髓系白血病中的表达及其意义[J]. 中华血液学杂志, 2003, 24(5): 249-252.

[3] Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, *et al*. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics[J]. Cancer Res, 2004, 64(10): 3365-3370.

[4] Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K, *et al*. Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 29-33.

[5] Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, *et al*. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes[J]. Blood, 2000, 96(6): 2240-2245.

[6] Ruan G R, Liu Y R, Chen S S, *et al*. Effect of antisense VEGF cDNA transfection on the growth of chronic myeloid leukemia K562 cells in vitro and in nude mice[J]. Leuk Res, 2004, 28(7): 763-769.

[7] 许文林, 沈慧玲, 袁 伟, 等. K562细胞血管内皮生长因子自分泌链作用的实验研究[J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(3): 189-193.

(编辑 邓强庭)

我校研制的“口服重组幽门螺杆菌疫苗”获国家一类新药证书

国家科技部4月23日在京召开新闻发布会宣布,我校邹全明教授率领他的团队历时15年研制的“口服重组幽门螺杆菌疫苗”(简称*Hp*疫苗),日前获国家食品药品监督管理局批准颁发的国家一类新药证书。这是迄今为止世界上首个*Hp*疫苗,标志着我国在预防幽门螺杆菌感染及相关胃病研究领域跃居国际领先水平。

临床研究表明,*Hp*疫苗作为国际首创的新型疫苗,具有良好的有效性和安全性,其保护率高达72.1%,可以预防幽门螺杆菌的感染,对维护人类生命健康将起到重要作用。该项目已获得8项国家发明专利,是具有完全自主知识产权的创新药物。

*Hp*是全球感染率最高的细菌之一。我国*Hp*感染者超过6亿人。如何预防和根治*Hp*引发的疾病一直是困扰国际医学界的世界性难题。邹全明教授带领的研究团队历经15年拼搏,获取了*Hp*疫苗的设计原理、种子工程菌株、工艺流程等一批原创性成果。他们首次创建了分子内佐剂黏膜疫苗理论,并采取独特的基因工程疫苗分子构建模式,在黏膜表面产生免疫力,解决了*Hp*在黏膜表面感染而难以防治的难题;采用特殊工艺和剂型,克服了胃酸、胃蛋白酶对疫苗的破坏作用,提高了疫苗的稳定性和有效性。据悉,该疫苗的后期工作正积极推进,可望在不久的将来实现产业化。

——摘自《第三军医大学报》2009年第258期第1版