J Acquir Immune Defic Syndr, 2010, 53(Suppl 1): S1 – S3.
[2] Feng Y, Wu Z, Detels R, *et al*. HIV/STD prevalence among men who have sex with men in Chengdu, China and associated risk factors for HIV infection[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010, 53(Suppl 1): S74 – S80.
[3] Zou H, Wu Z, Yu J, *et al*. Sexual risk behaviors and HIV infection among men who have sex with men who use the internet in Beijing and Urumqi, China[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010, 53(Suppl 1): S81 – S87.
[4] Feng L, Ding X, Lu R, *et al*. High HIV prevalence detected in 2006 and 2007 among men who have sex with men in China's largest municipality: an alarming epidemic in Chongqing, China[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009, 52(1): 79 – 85.
[5] 冯连贵，丁贤彬，卢戎戎，等. 重庆市男男性接触者艾滋病病毒感染率及其影响因素[J]. 中华预防医学杂志，2008，42(12)：870 – 874.
[6] 冯连贵，丁贤彬，吕繁，等. 重庆市男男性行为人群艾滋病干预效果初步研究[J]. 中华流行病学杂志，2009，30(1)：18 – 20.
[7] Allman D. M is for Mutual a is for Acts: Male sex workers and AIDS in Canada[M]. Health Canada, 1999.
[8] 李群辉，吴昊，孙丽君，等. 男性性工作者STDs/HIV感染状况及其相关危险因素分析[J]. 首都医科大学学报，2006，27(6)：754 – 757.
[9] 庄弢，毛晓英，刘刚，等. 86名男性性工作者AIDS相关情况调查[J]. 中国艾滋病性病，2005，11(5)：329 – 332.
[10] 欧阳琳，冯连贵，丁贤彬，等. 采用同伴推动抽样法在重庆市男男性行为人群中开展HIV流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志，2009，30(10)：1001 – 1004.
[11] 邵长庚. 性传播疾病的预防与控制——项目管理手册[M]. 北京：科学出版社，2000：24 – 29.

(收稿：2010-09-13 修回：2010-11-07)
(编辑 邓强庭)

文章编号：1000-5404(2011)03-0321-03

短篇论著

RhoC-siRNA联合Rapamycin抑制人肝癌细胞Bel7402 VEGF表达

金 哲，王广义，谢淑丽，吕国悦 (130021 长春，吉林大学第一医院肝胆胰外科)

【摘要】 **目的** 检测RhoC-siRNA联合Rapamycin(Rapa)抑制人肝癌细胞Bel7402 VEGF表达。**方法** 实验以人肝癌细胞Bel7402为研究对象，分别设空白对照组、溶媒组、Rapa组、阴性对照组、阴性对照联合Rapa组、RhoC-siRNA组、RhoC-siRNA联合Rapa组，按不同实验组分别应用RhoC-siRNA、Rapa或RhoC-siRNA联合Rapa，采用RT-PCR和Western blot方法检测各实验组细胞VEGF的表达。**结果** 转染RhoC-siRNA组细胞VEGF mRNA表达的抑制率为55.7%，应用Rapa组细胞VEGF mRNA表达的抑制率为17.3%，二者联合应用对VEGF mRNA表达的抑制率比单纯转染RhoC-siRNA和单纯应用Rapamycin抑制率分别提高20.3%和58.2%；转染RhoC-siRNA组细胞VEGF蛋白表达的抑制率为53.5%($P<0.01$)，应用Rapa组细胞VEGF蛋白表达的抑制率为15.7%($P<0.05$)，二者联合应用对VEGF蛋白表达的抑制率比单纯转染RhoC-siRNA和单纯应用Rapa抑制率分别提高18.4%和55.4%($P<0.01$)。**结论** 沉默RhoC基因联合抑制mTOR蛋白，可增强对肝癌细胞Bel7402 VEGF表达的抑制，为肝癌的生物学治疗提供重要的实验依据。

【关键词】 RhoC；mTOR；血管内皮生长因子；肝癌细胞
【中图法分类号】 R73-362；R735.7 **【文献标志码】** A

新生血管形成是肿瘤发展的基本特点，新生血管为肿瘤提供其发展所必需的养分与氧，并可成为肝癌细胞血行转移的便捷通路。包括肝癌在内，大多数恶性肿瘤的生长和转移依赖于血管生成。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)是刺激肿瘤血管生成的最重要因子之一。研究证实，VEGF水平反映肝癌生长速度和转移倾向，可作为监测肿瘤转移的指标[1]。目前已知，沉默RhoC基因或Rapamycin抑制mTOR蛋白功能均可抑制肿瘤细胞VEGF的表达。但二者联合应用是否可增强抑制肿瘤细胞VEGF的表达效果从而改善肿瘤的恶性度还未见报道。本实验拟通过转染RhoC-siRNA表达载体及应用Rapamycin，观察沉默RhoC基因联合抑制mTOR蛋白功能对肝癌Bel7402细胞VEGF表达的影响。

【通信作者】 王广义，电话：(0431)88782421，E-mail：dyypuwaike@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和载体 人肝癌细胞株Bel7402由吉林大学第一医院肝胆胰外科实验室保存。RNAi真核表达载体pU6mRFP由吉林大学白求恩医学院免疫学教研室朱明光博士惠赠。该载体由pSilencer1.0-U6和pDsRed.N1重组而成，含有氨苄青霉素抗性基因，用于阳性克隆筛选。pU6mRFP RhoC-siRNA和pU6mRFP scramble-siRNA质粒由本室构建[2]。

1.1.2 试剂与仪器 质粒提取试剂盒(鼎国生物技术公司，北京)，RT-PCR kit、DNA marker DL2000 (TaKaRa Japan)，Superfect transfect reagent (Qiagen，Germany)、Rapamycin (LC

Laboratories,USA)、MTT(Sigma,USA),各种抗体(Santa Cruz USA),酶标仪(BIO-TEK,USA),PCR仪(Hybaid Omnislide,USA),半干式转膜仪(Bio-Rad USA),凝胶成像仪(上海天能科技公司),紫外分光光度计(上海光学仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测细胞D值确定Rapa给药浓度 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养液制备单细胞悬液并细胞计数,以4 000个/孔细胞接种于96孔板。37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育24 h后以不同浓度Rapa(0、5.67、6.24、6.87、7.55、8.31、9.14、10.05、11.06 mg/L)作用于细胞48 h,MTT法检测细胞增殖抑制率。抑制率=(1-加药孔细胞*D*值/对照孔细胞*D*值)×100%。

1.2.2 质粒提取、转染 参照质粒提取试剂盒说明书提取并纯化质粒后转染肝癌Bel 7402细胞;转染步骤见转染试剂产品说明书。

1.2.3 检测RhoC基因的沉默效应 设转染RhoC-siRNA的细胞为RNAi组,转染scramble-siRNA的细胞为阴性对照组,未转染的Bel7402细胞为空白对照组。转染72 h后,Trizol法裂解细胞并提取总RNA,RT-PCR法检测RhoC基因表达;RhoC引物正义链:5′-ATGGCTGCAATCCGAAAGAAG-3′,反义链:5′-TCAGAGAATGGGACAGCCCCT-3′;内参照α-tubulin引物正义链:5′-CACCCGTCTTCAGGGCTTCTTGGTTT-3′,反义链:5-CATTTCACCATCTGGTTGGCTGGCTC-3′;反应条件:94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,RhoC 30个循环,α-tubulin 25个循环。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后拍照,Image Master图像分析系统测定灰度值,以各组目的基因灰度值/相应泳道中a-tubulin灰度值进行数据分析,抑制率=(对照组灰度值比值-实验组灰度值比值)/对照组灰度值比值×100%。

1.2.4 RT-PCR法检测RhoC、VEGF mRNA表达 实验分如下7组:空白对照组、溶媒组(培养液含1%无水乙醇,以模拟作为溶媒溶解Rapa的无水乙醇对细胞的影响)、Rapa组、阴性对照组(转染scramble-siRNA)、阴性对照联合Rapa组(转染scramble-siRNA 24 h后给予Rapa)、RNAi组(转染RhoC-siRNA)、RNAi联合Rapa组(转染RhoC- siRNA 24 h给予Rapa)。4000个/孔细胞接种6孔板24 h进行转染,继续培养24 h,给予Rapa作用48 h后,检测各组细胞VEGF mRNA的表达。VEGF引物正义链:5′-TTCATGGATGTCTATCAGC G-3′;反义链:5′-GCTCATCTCTCCTAT GTGCT-3′。反应条件:94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30个循环。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后拍照、测定灰度值。

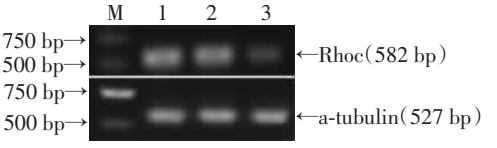
1.2.5 Western blot检测VEGF蛋白表达 按不同实验组分别给予Rapa 48 h后,蛋白裂解液充分裂解细胞,Bicinchoninic acid(BCA)法蛋白定量。蛋白经电泳分离,电转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭过夜,次日进行VEGF抗体杂交:1∶200兔抗人一抗37 ℃反应2 h,1×TBS-T(pH 7.6)溶液洗膜3次;1∶500的山羊抗兔二抗37 ℃孵育1.5 h,1×TBS-T溶液洗膜30 min。ECL化学发光及显影、定影,检测PVDF膜上VEGF蛋白的表达,测定灰度值。蛋白抑制率=(对照组灰度值比值-实验组灰度值比值)/对照组灰度值比值×100%。

1.2.6 统计学分析 实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,通过SPSS 13.0统计软件,采用*t*检验、*F*检验方法进行分析。

2 结果

2.1 RhoC基因表达抑制效应

图1所示,与空白对照组及阴性对照组比较,RNAi组RhoC mRNA表达受到显著抑制[(0.39±0.09) *vs* (1.35±0.15)和(1.22±0.13),$P<0.01$],空白对照组与阴性对照组之间RhoC mRNA表达无统计学差异($P>0.05$)。



M:标准;1:空白对照组;2:阴性对照组;3:RNAi组

图1 RT-PCR法检测RhoC基因沉默效果

2.2 Rapa对细胞的增殖抑制作用

图2所示,Rapa对肝癌Bel7402细胞的增殖抑制率随着其作用浓度的增加而增高,提示Rapa对肝癌Bel7402细胞的增殖抑制作用具有浓度依赖性。Rapa作用浓度为9.14 mg/L时所对应的增殖抑制率为(34.48±7.88)%,大于30%,本实验采用了9.14 mg/L的Rapa作用浓度。

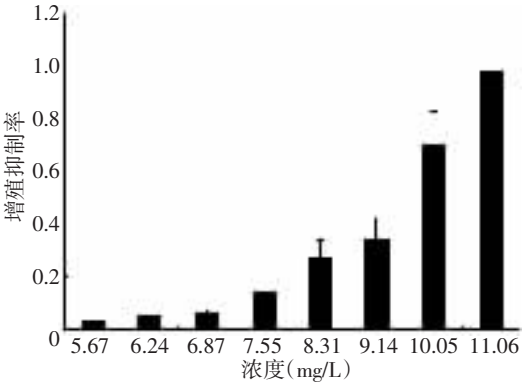
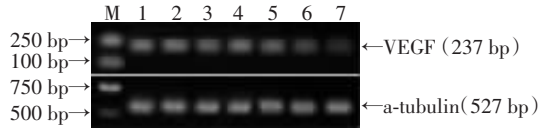


图2 MTT检测不同浓度Rapa对Bel7402细胞的增殖抑制率

2.3 VEGF mRNA水平检测结果

图3所示,空白对照组、溶媒组、阴性对照组之间VEGF mRNA表达水平无显著差异[(0.81±0.05),(0.82±0.06),(0.79±0.06),$P>0.05$];Rapa组与阴性对照联合Rapa组之间VEGF mRNA表达水平无显著差异[(0.67±0.07) *vs* (0.65±0.08),$P>0.05$)];Rapa组与空白对照组和阴性对照组比较VEGF mRNA表达水平降低[(0.67±0.07) *vs* (0.81±0.05)和(0.79±0.06),$P<0.05$],抑制效率为17.3%,具有统计学意义;RNAi组与空白对照组和阴性对照组比较,VEGF mRNA的表达水平明显降低[(0.35±0.05) *vs* (0.81±0.05)和(0.79±0.06),$P<0.01$],抑制效率为55.7%。RNAi联合Rapa组与RNAi组和Rapa组比较VEGF mRNA表达水平显著降低[(0.19±0.04) *vs* (0.35±0.05)和(0.67±0.07) $P<0.01$]。

RNAi 联合 Rapa 组比 RNAi 组抑制效率提高 20.3%，比 Rapa 组提高 58.2%。

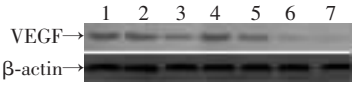


M：标准 1：空白对照组 2：溶媒组 3：Rapa 组 4：阴性对照组 5：阴性对照联合 Rapa 组 6：RNAi 组 7：RNAi 联合 Rapa 组

图3 RT-PCR 法检测各组 VEGF mRNA 表达

2.4 VEGF 蛋白水平检测结果

Rapa 组比空白对照组和阴性对照组 VEGF 蛋白表达水平降低，抑制率约 15.7%（$P<0.05$）；RNAi 组比空白对照组和阴性对照组 VEGF 蛋白表达明显降低，抑制率约 53.5%（$P<0.01$）；RNAi 联合 Rapa 组比 RNAi 组和 Rapa 组 VEGF 蛋白表达显著降低，抑制效率分别提高 18.4% 和 55.4%（$P<0.01$）。



1：空白对照组 2：溶媒组 3：Rapa 组 4：阴性对照组 5：阴性对照联合 Rapa 组 6：RNAi 组 7：RNAi 联合 Rapa 组

图4 Western blot 检测各组 VEGF mRNA 表达

3 讨论

VEGF 高表达与肿瘤血管及淋巴管生成关系密切[3]，且 VEGF 被认为是在刺激肿瘤血管形成、增加毛细血管和小静脉通透性方面作用最强大的物质之一。癌组织内高表达的 VEGF 诱导产生高通透性、密集网状分布的微血管，使脱离母瘤的癌细胞极易进入血管实现血行转移。下调 VEGF 表达或阻断 VEGF 与其受体的作用可抑制肿瘤血管生成及肿瘤的生长[4]。

RhoC 属于 Ras 超家族 GTP 蛋白酶，是 MAPK 信号通路上游重要的信号分子。有实验证实，RhoC 蛋白活化可激活 MAPK 和 Akt 的功能[5]。VEGF 分泌及血管生成可能同时受到 MAPK 及 IKK/NF-κB 通路的调控，同时抑制两条通路才能明显抑制 VEGF 基因的表达[6]；而 Akt 主要功能之一就是磷酸化 IKK，最终通过 NF-κB 的释放，促进基因转录。已有实验证实，沉默 RhoC 基因，可通过抑制 VEGF 基因的表达，抑制肿瘤血管的生成[7]。

缺氧诱导因子（hypoxia-inducible factor-1，HIF-1）是调控 VEGF 基因转录的重要因子。Wang 等[8]研究认为，Rapa 可能是通过抑制 mTOR/HIF-1α/VEGF 信号传导通路抑制了 VEGF 基因表达。此外，mTOR 作为 Akt 的下游靶分子，Akt 的活化也将激活 mTOR 蛋白，促进 VEGF 基因的转录。与单纯抑制 Akt 或 mTOR 蛋白功能相比，联合抑制 Akt 及 mTOR 蛋白可明显提高对 VEGF 基因表达的抑制效果[8]。

本实验结果显示，沉默 RhoC 基因表达采用 Rapa 抑制 mTOR 蛋白功能，均出现 VEGF 表达受抑；作为溶媒溶解 Rapamycin 的无水乙醇及单纯的空白质粒转染对 Bel7402 细胞 VEGF 表达无明显影响。提示，VEGF 表达同时受 RhoC 及 mTOR 蛋白的调控。

RhoC 与 mTOR 蛋白通过影响 MAPK 与 P13K/Akt/mTOR 信号通路参与了对 VEGF 基因表达的调控。从此前掌握的资料分析，两者对 VEGF 基因表达的调控机制可能有所区别[5-8]。故我们推测，同时抑制 RhoC 与 mTOR 蛋白功能，将通过多种途径实现对 VEGF 基因表达的联合抑制，提高抑制效果。本实验结果显示，沉默 RhoC 基因联合抑制 mTOR 蛋白功能后更进一步下调了 VEGF 的表达。

综上所述，沉默 RhoC 基因联合抑制 mTOR 蛋白功能，可进一步增强对 VEGF 表达的抑制，从而将更有效地阻遏肿瘤血管形成及肝癌转移。

参考文献：

[1] Poon R T, Lau C, Pang R, *et al*. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies [J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(6): 1835-1845.

[2] 谢淑丽. RhoC 基因对肝癌细胞生物学行为影响及机制的实验研究[D]. 长春：吉林大学基础医学院，2009.

[3] 邱敏，梁志清，熊光武，等. VEGF-A 与卵巢癌淋巴管和血管生成的关系研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：1020-1022.

[4] Sullu Y, Gun S, Atmaca S, *et al*. Poor prognostic clinicopathologic features correlate with VEGF expression but not with PTEN expression in squamous cell carcinoma of the larynx[J]. Diagn Pathol. 2010, 5: 35.

[5] Iiizumi M, Bandyopadhyay S, Pai S K, *et al*. RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(18): 7613-7620.

[6] Bancroft C C, Chen Z, Dong G, *et al*. Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(2): 435-442.

[7] Wang W, Wu F, Fang F, *et al*. RhoC is essential for angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma cells via regulation of endothelial cell organization[J]. Cancer Sci, 2008, 99(10): 2012-2018.

[8] Wang W, Jia W D, Xu G L, *et al*. Antitumoral activity of rapamycin mediated through inhibition of HIF-1alpha and VEGF in hepatocellular carcinoma [J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(10): 2128-2136.

[9] Kurmasheva R T, Harwood F C, Houghton P J. Differential regulation of vascular endothelial growth factor by Akt and mammalian target of rapamycin inhibitors in cell lines derived from childhood solid tumors [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(5): 1620-1628.

（收稿 2010-09-06 修回 2010-10-28）
（编辑 邓强庭）