

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )03-0167-07

## 抑制 VEGF 表达的锤头状核酶系统

李 晶<sup>1,2</sup>, 费 琦<sup>1,2</sup>, 杨剑峰<sup>1,2</sup>, 高宝梅<sup>1</sup>, 戴信兰<sup>1</sup>, 张红宇<sup>1</sup>, 朱景德<sup>1,3</sup> ( 1. 上海交通大学肿瘤研究所, 癌基因与相关基因国家重点实验室, 上海 200032; 2. 复旦大学上海医学院, 上海 200032; 3. 浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018 )

[ 摘 要 ] 目的: 建立和评估抑制血管内皮生长因子( VEGF )表达的锤头状核酶( hammerhead ribozyme )技术系统。方法: 对 VEGF121 基因 RNA 序列进行二级结构分析, 选择靶点; 设计并构建针对 VEGF 的分泌肽 RNA 的可表达锤头状核酶( 1-4 )载体系统和 VEGF-荧光色素酶融合基因报告质粒; 通过试管内切割实验等方法评估核酶对于试管内转录得到的 VEGF RNA 切割特异性和效率; 通过瞬时共转染实验和稳定转染实验评估核酶在细胞内对于 VEGF RNA 的切割效率。结果: 设计和构建了对 VEGF RNA 二级结构水平上的暴露区( +8, +36 和 +71 位点; 核酶 1,3 和 4 )和非暴露区( +17 位点; 核酶 2 )4 个锤头状核酶( 1-4 )的两套质粒; 试管内切割检测表明, 针对 +8, +36 和 +71 位点的核酶( 1,3 和 4 )可以有效地在试管内对 VEGF RNA 进行特异性切割, 使其水平分别降至对照的 61.7% , 27.6% 和 44.8% ( 荧光色素酶活性 ) 或 66.3% , 27.0% 和 30.0% ( 蛋白质水平 ); 将核酶表达质粒与 VEGF-LUC 模板质粒瞬时共转染入 SMMC-7721 肝癌细胞, 核酶 1,3 和 4 VEGF-LUC 水平分别降低到对照的 81.4% , 56.6% 和 69.1% ; 稳定表达针对 VEGF 的核酶 1, 3 或 4 的 SMMC-7721 细胞株中, 内源性 VEGF RNA 的水平降至对照水平的 5% 以下。对照未转染的、转染空载体的和转染了核酶 2 ( +17 ) 的 SMMC-7721 细胞。结论: 分别针对 VEGF +8, +36 和 +71 位点锤头状核酶可有效地抑制 VEGF 的 RNA 水平。

[ 关键词 ] 血管内皮生长因子; 锤头状核酶; 试管内和细胞内核酶剪切实验; 抗血管生成

[ 中图分类号 ] R730

[ 文献标识码 ] A

## The Hammerhead Ribozyme Mediated Repression of VEGF for Cancer Gene Therapy

LI Jing<sup>1,2</sup>, FEI Qi<sup>1,2</sup>, YANG Jian-feng<sup>1,2</sup>, GAO Bao-mei<sup>1</sup>, DAI Xin-lan<sup>1</sup>, ZHANG Hong-yu<sup>1</sup>, ZHU Jing-de<sup>2,3</sup> ( 1. The State Key Laboratory for Oncogenes and Related Genes, Cancer Institute of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. The Collage of Life Sciences, Zhejiang Science and Technology University, Xiasha University District, Hangzhou 310018, China )

[ Abstract ] **Objective:** To establish a novel and robust hammerhead ribozyme system against the Vascular Endothelial Growth Factor ( VEGF ) for anti-cancer gene therapy. **Methods:** The structural analysis of the 2<sup>nd</sup> structure of the VEGF RNA and the vector construction of hammerhead ribozymes ( 1-4 ) against VEGF leader region ( +1 to +75 ); The *in vitro* analyses of ribozyme mediated specific cleavage; The *in cell* evaluation of the ribozyme mediated cleavage of the VEGF RNA. **Results:** Ribozymes targeting +8, +36, or +71 ( Rz1,3 and 4 ) of the exposed region or +17 ( Rz2 ) of the unexposed region of VEGF RNA were constructed in pGVal and pFB retroviral vector systems; Rz1,3 and 4, but not Rz2, specifically cleaved the VEGF RNA and brought the VEGF RNA level down to 61.7% , 27.6% and 44.8% ( luciferase activity ) as well as 66.3% , 27.0% and 30.0% ( protein level ) of the control; The same set of ribozymes reduced the co-transfected VEGF-LUC RNA level down to 81.4% , 56.6% and 69.1% of the control in a transient transfection analysis and essentially abolished the endogenous VEGF RNA in the stable transfected setting. **Conclusion:** We have established three effective hammerhead ribozyme vector systems targeting +8, +36 and +71 of the VEGF RNA.

[ Key words ] vascular endothelial growth factor( VEGF ); hammerhead ribozyme; the ribozyme mediated cleavage *in vitro* and *in cell*; anti-angiogenesis

[ 基金项目 ] 上海市科委( 04DZ14006 ); 国家自然科学基金委( 30450001 ); 973 项目( 2004CB518804 ); 863 项目( 2002AA2Z3352 )

[ 作者简介 ] 李 晶( 1980- ), 硕士生; 费 琦( 1980- ), 博士生; 杨剑峰( 1978- ), 硕士, 贡献同等, 共为第一作者

[ 通讯作者 ] 朱景德, E-mail: zhujinde@sh163.com

血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF )通过刺激和加强血管内皮的通透性来影响

血管的生成和功能<sup>[14]</sup>,是研究最为清楚的促血管生成因子之一<sup>[2]</sup>。通过对肿瘤中 VEGF 的过度表达进行抑制,是肿瘤基因治疗的重要研究方向<sup>[5]</sup>。以抗血管生成作为关键的抗肿瘤的分子生物学手段还包括抑制 VEGF 及其受体的激酶活性的小分子药物<sup>[6]</sup>和在其表达的转录和转录后环节上的抑制。后者的手段包括反义核酸技术(antisense RNA or DNA)<sup>[7-8]</sup>,RNA 干扰(RNA interference)<sup>[9]</sup>和核酶<sup>[10]</sup>。核酶是能够特异性地与靶 RNA 分子配对,继而在特定的位点切割后者,中止相应蛋白产生的核糖核酸分子<sup>[11]</sup>。在核酶家族中,锤头状核酶(hammerhead ribozyme)最小(长约 40~50 个核苷酸),有结构简单和设计简易的优点,因而得到较广泛的重视<sup>[12-13]</sup>。本研究旨在建立表达针对 VEGF 的有效锤头状核酶的基因载体系统,为开展抑制血管生成所介导的肿瘤基因治疗提供有效的手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pcDNA3-HA 是在 Invitrogen 的 pcDNA 载体基础上添加 3 个 HA 多肽标签序列所构建。pGVal 核酶表达质粒是一种克服了核酶稳定性低等缺陷的核酶表达系统(Andre Lieber 馈赠)<sup>[14]</sup>。TNT<sup>®</sup> T7 Quick Coupled Transcription/Translation System 试管内转录/翻译试剂盒, TNT<sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate System 试管内翻译试剂盒以及 Luciferase 荧光酶底物(Promega 公司)。Lipofectamine 及 SuperScript II Reverse Transcriptase 反转录系统(Invitrogen 公司)。HA 抗体(SantaCruz 公司)。肝癌细胞株 SMMC-7721(上海生科院细胞库 No. TCHu68)。

1.2 VEGF RNA(NM001025370)二级结构的预测和锤头状核酶的设计<sup>[15-16]</sup>。

### 1.3 质粒载体的构建

#### 1.3.1 核酶表达质粒的构建

针对 VEGF 信号肽编码区(+1~+75)中的合适位点 +8(5'-tcgaagcagactgatgagtcctgaggacgaa agttcatcttgca-3'和 5'-agatgaacttcgtcctcacggactcatcagctctgct-3'), +17(5'-tcgaaccaactgatgagtcctgaggacgaaacatcagaatgca-3'和 5'-ttctgctgttcgtcctcacggactcatcagcttggt-3'), +36(5'-tcga-caaggcctgatgagtcctgaggacgaaaggetccaatgca-3'和 5'-ttg-gagccttcgtcctcacggactcatcaggccttg-3')和 +71(5'-tcgagcct-ggctgatgagtcctgaggacgaaaccacttggtgca-3'和 5'-ccaagtgttcgtcctcacggactcatcagccaggc-3')的核酶寡核苷酸(图 1)经 5'端加磷,退火成双链 DNA 后克隆至 pGVal 载体的 Sal I 和 Pst I 位点中而得到 pGVal-Rz1(+8), pGVal-Rz2(+17), pGVal-Rz3(+36)和 pGVal-Rz4(+

71)四个质粒。通过酶切和测序确定其正确(图 2)。

#### 1.3.2 VEGF 表达质粒的构建

取自质粒 pcDNA3/VEGF 的 BamH I 和 Xba I 间的 VEGF 编码片段,克隆入 pcDNA-HA 载体多克隆位点中 BamH I 和 Xba I 位点之间,获得克隆 VH。用 5'-ccgctcgagccgctcggcttg 3'和 T7 引物通过 PCR 方法对 VH 中的 VEGF121 进行终止密码子的缺失突变,继而将其克隆到 HA-LUC(在 HA 载体中装入了萤火虫荧光色素酶报告基因,简称 LUC)载体的 BamH I 和 Xho I 位点中,得到带有 HA 标签的 VEGF-LUC 融合基因的表达载体,获得克隆 VHL(图 2)。

#### 1.3.3 核酶逆转录病毒载体 pFB-Rz 的构建

pGVal 载体及其表达核酶 1-4 的 pGVal-R<sub>2</sub>(1-4)质粒 DNA 的 Xba I(补平)、Mlu I 片段(大小:520 bp 和 570 bp,包括维持核酶活性结构的 Va I, Va II, Loop 序列)克隆至 pFB-neo 逆转录病毒载体(Stratagene 公司)的 EcoR I(补平)、Mlu I 位点中。经酶切和测序对质粒加以鉴定。

### 1.4 试管内核酶剪切特异性和效率的评估

#### 1.4.1 试管内转录以获得核酶与 VEGF RNA(VHL)模板

遵厂商程序,用 TNT<sup>®</sup> T7 Quick Coupled Transcription 系统对线性化 VHL(Xba I)和 pGVal-Rz(1-4)(Hind III)进行试管内转录,随之对所得的 RNA 以 RT-PCR 的方法进行定量(以梯度稀释的质粒 DNA 作为定量内参)。

#### 1.4.2 核酶介导的对 VEGF RNA 切割实验

1 nmol/L 核酶和底物 RNA 在 Tris(pH 7.5)50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L 溶液中 95℃ 下变性 90 s, 随即冰上 2 min 后,向其加入 MgCl<sub>2</sub>至终浓度 10 mmol/L, 37℃ 反应 1 h。切割产物经乙醇沉淀,溶解于 DEPC 水中。

1.4.3 引物延伸分析 试验基本按照我们已报告过的程序进行<sup>[17]</sup>。探针(vegfp1: 5'-tggcagtagctgcgctgat-agacatccatg-3' +110~+84, 和 vegfp2: 5'-tgcagcctgg-gaccactggcatggtg-3', +81~+54)。

#### 1.4.4 试管内翻译

对切割过的采用 TNT<sup>®</sup> T7 Quick Coupled Translation System 试管内翻译试剂盒及其标准步骤进行试管内翻译。取 2 μl 试管内翻译产物,加入 10 μl H<sub>2</sub>O 混匀,与 30 μl Luciferase 底物混合,测定 10 s 的荧光度。取剩余的试管内翻译产物,加入 5×蛋白上样缓冲液,65℃ 变性 10 min。用 7.5% 的 SDS PAGE 进行分离。电泳结束后用半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。转移结束后,在 1:1 000 稀释的 HA (Catalogue

No. SC-7392, 美国 Santa Cruz 公司)一抗(抗体稀释在 PBS + 0.05% Tween-20 + 5% 脱脂奶粉中)中 4℃ 结合过夜。膜用 PBST 洗 3 次,每次 15 min。在 1:5 000 稀

释的抗鼠二抗中室温处理 1 h,洗膜同上。加入 ECL (美国 Pierce 公司)底物显色。

图 1 VEGF RNA 的一、二级结构和锤头状核酶

Fig. 1 The 1st and 2nd structure of the VEGF RNA as well as the designated ribozymes concerns

A: Ribozyme and its RNA substrate. The essentials are indicated, including the catalytic core, the pairing regions, the UHN sequence; B: The 2nd structure of the VEGF RNA and the target sites of the designed ribozymes (Rz1 to 4) are indicated by both circles and arrows; C: The 1st structure of the VEGF RNA and the essentials: the target location(ribozyme), the leader sequence (in italic), the primers for the primer extension and RT-PCR analysis

### 1.5 共转染实验

遵厂商程序用 Lipofectamine(美国 Invitrogene 公司)将核酶表达质粒 pGval-Rz(1-4)与 VEGF 表达质粒(VHL)按照 4:1(2 μg:0.5 μg)比例瞬时共转染 SMMC-7721 细胞(同时转染 0.1 μg 的以受 CMV 启动子控制的 Renilla 荧光素酶基因载体)。37℃ 孵育 24 h 后,测定细胞裂解液中两种荧光素酶的活性。结果以 Renilla 荧光素酶活性校正后的相对萤火虫荧光素酶活性的核酶与非核酶对照间的比值来作图表示。

### 1.6 核酶稳定细胞株的建立及核酶对内源性 VEGF RNA 水平的半定量 RT-PCR 分析

遵厂商程序用 Lipofectamine 将线性化的 pGval 和 pGval-Rz(1-4)质粒 DNA 分别转染到 SMMC-7721 细胞中,通过 G418 处理,筛选出表达无核酶及各自核酶的稳定细胞株。通过半定量 RT-PCR 分析对核酶(以特异性下游引物作逆转录)和 VEGF(oligo-dT 引物作逆转

录)的水平进行分析。RT-PCR 引物见表 1。

## 2 结果

### 2.1 核酶的设计和表达载体的构建

锤头状核酶由三个部分组成,即一个保守的催化域和两段用于与靶 RNA 分子配对结合的区域(图 1A)。在催化切割的过程中<sup>[10]</sup>,锤头状核酶首先通过两段特异序列与靶分子配对结合,然后在 NUH 位点进行切割(其中 N 可以为任一种核苷酸,H 是除了 G 以外的任一种)<sup>[15]</sup>,核酶随即解离,再结合另一靶点分子开始新一轮反应,而被切割的 RNA 分子则降解掉。受切割 RNA 分子的靶序列应位于其高级结构上充分暴露的区域。为此,我们用 MFOLD 软件对 VEGF RNA 二级结构进行预测<sup>[16]</sup>(图 1B 和 C),并从 VEGF 的分泌肽区(+1-+75),选择了 3 个暴露区中的合适位点(+8, +36 和 +71, Rz1, 3 和 4)和 1 个非暴露区的位

点(+17, Rz2)。影响锤头状核酶在细胞内切割效率的因素有三:核酶在细胞内的表达水平,核酶的胞内稳定性,酶与底物配对结合的效率。Lieber A<sup>[14]</sup>所发展的 pGVal 载体在理论上很好地解决了这些难点。该载体中使用 pol III 启动子可确保核酶基因的高效表达,核酶基因整合在 Val 小分子 RNA 基因中的暴露区,既保证了核酶的稳定性、也确保了核酶 RNA 的充分暴露(图 2A)。用所设计的核酶分子的引物将核酶直接克

隆到 pGVal-Rz 载体中,获得 pGVal-Rz1-4(图 2B)后经酶切分析(图 2C)和测序,核实其正确(未示)。为便于分析,我们还构建了既可通过 T7 RNA 多聚酶进行试管内转录和翻译,又可在真核细胞中表达的载体(HA),来表达 HA 标签肽 3 体-VEGF(VH)或 HA 标签肽 3 体-VEGF-荧光色素酶(HA-VEGF-LUC)RNA 及蛋白(VHL)(图 2D),经试管内转录和翻译,Western 分析(HA 抗体)证实目标蛋白能够如预期表达(图 2E, F)。

图 2 表达核酶的 pGVal 或 VEGF 的载体

Fig. 2 The pGVal for ribozymes and the constructs of the VEGF for the analysis

A: pGVal vector and the hypothetic pattern of the interaction between the ribozyme and RNA substrates; B: The construction scheme of pGVal-Rz; C: The diagnostic digestion of the pGVal-Rz and pGVal with Sal I and Pst I, respectively; (N: The uncut; and the cut with Sal I (S) or Pst I (P); M: the size markers); D: The structural outline of VH and VHL; E: The diagnostic digestion of VHL by Xho I, BamH I, and Xba I in combination; F: The VHL protein (82 kd) was made by the *in vitro* transcription/translation of the linearized VHL DNA and detected by an anti-HA mediated Western analysis.

表 1 RT-PCR 分析所用的引物

Tab. 1 Primer for RT-PCR

	Sense primer(5' ~ 3')	Antisense primer(5' ~ 3')	Product Length
VEGF	ctgaggagtccaacatcacc	cacgetcaggacttatacc	206 bp
Ribozyme	tgtcgcacgtcgtcgac	acgtcggttaccgccc	Ribozyme 100 bp Blank Vector 55bp
$\beta$ -actin	aagtactccgtgtggatcgg	tcaagttggggacaaaaag	616 bp

2.2 试管内剪切反应结果表明 Rz1,3 和 4 可有效地特异性地切割 VEGF121RNA, 但 Rz2 则否

为了确定所设计的核酶能否对靶 RNA 分子作有效的顺序特异性切割, 我们通过 T7RNA 聚合酶介导的试管内转录系统以线性化的 VH, VHL 和 pGVal-Rz(1-4)DNA 为模板获得了相应的 RNA, 经半定量 RT-PCR 定量后, 分别用 4 个核酶的 RNA 分子, 按材料方法中所述条件对 VEGF RNA 或 HA-VEGF-LUC 进行切割, 并用引物延伸法在序列水平上确定切割位点。如图 3 所示, Rz1(+8), 3(+36) 和 4(+71) 可以在预期的位点处切割, 形成与预期相同的延伸条带。其中以 Rz3

最为有效。Rz2 切割(+17) 则无可检出的切割活性, 这与该位点在 RNA 二级结构上处于非暴露区的生物信息学分析预期(图 1B, C) 相符。为更好地对切割效率进行量化评估, 我们对切割后 HA-VEGF-LUC RNA 进行翻译, 继而检测荧光素酶活性和 VEGF-LUC 靶蛋白的量。结果显示经 Rz1, 3, 4 切割后可使 VEGF-LUC 的荧光色素酶活性降低到对照(经无核酶的 RNA 共孵育)的 44.8%, 27.6% 和 61.7% (图 4A), 其蛋白量降至对照的 31.9%, 27.0% 和 66.3% (图 4B)。而经 Rz2 处理的相关数值(90.4% 和 97.8%) 与对照相差甚微(图 4)。

图 3 用引物延伸法评估试管内核酶酶切反应特异性和有效性

Fig. 3 Evaluation of the ribozyme mediated specific cleavage of VEGF by primer-extension analysis.

A: The target sequence of ribozyme and the primers for the primer-extension analysis; An equal mole of ribozyme and VEGF RNA substrate was incubated in the designated condition, followed by analysis. The sequence ladder (U, C, G and A) was made with the same primer by Sanger reaction for the precise mapping of the cleavage sites; Panel B to E: Rz1 to Rz4, respectively. The arrows indicate the extended bands, reflecting the designated cleavage.

2.3 细胞内实验表明 Rz1,3 和 4 可有效地特异性地切割 VEGFRNA, 但 Rz2 则否

鉴于细胞内 RNA 多与蛋白复合, 上述以纯 RNA 为对象的试管内切割实验所获得的结果(图 2-3) 是否完全反映细胞内的情形仍属未知。我们继而将核酶表达质粒: pGVal-Rz(1-4) 或空载体与 VHL 共转染入 SMMC-7721 细胞(并以 Renilla 荧光素酶为内参照), 通过测定报告基因活性检验核酶的切割效果。图 5A 结

果提示, 核酶 1, 3 和 4 可分别使共转染的融合蛋白荧光素酶报告基因活性降低到对照的 81.5%, 52.6% 和 69.2%, 核酶 2 则否。我们继而用相应的以 pFB 逆转录病毒载体的核酶表达质粒转染, 继而通过 G418 药物筛选建立了稳定表达核酶的 SMMC-7721 细胞株(单克隆), 来进一步确定这些核酶各自在细胞内抑制 VEGF 表达的效率。通过对核酶、持家基因  $\beta$ -actin 和 VEGF 核酶的 RNA 水平进行了以 RT-PCR 的定量, 我们发

现: 在所有的细胞株中核酶均可有效表达, 并与持家基因  $\beta$ -actin 一样无明显的表达差别; 但稳定表达核酶 1, 3 和 4 细胞株中, VEGF 的水平近乎无法检出, 而在

SMMC-7721, 表达无核酶骨架及核酶 2 的细胞株表达水平很高(图 5B)。

图 4 在 VEGF 和荧光色素酶融合蛋白水平上评估试管内核酶的酶切反应有效性

Fig. 4 Evaluation of the ribozyme mediated cleavage at the protein level

The RNA recovered from the *in vitro* cleavage reactions of VHL template were translated. A and B, 2  $\mu$ l of the translated products were measured for the firefly luciferase activity, presenting in plot and in table; C and D, 8  $\mu$ l of the translated products was quantified by an anti-HA; Mediated Western analysis, presented in autorad and in density.

图 5 抗 VEGF 核酶细胞内切割效率

Fig. 5 Evaluation of the ribozyme cleavage of the VEGF in cell

A: The effect of the ribozyme on the luciferase activity from the co-transfected VHL construct was measured in the SMMC-7721 cell lysate; B: The effect of the ribozyme on the endogenous VEGF RNA in the stable transformed SMMC-7721 clones; Lanes 1-4: Rz1-4; 5: pGVal; 6: the parental SMMC-7721 cells; 7: the size markers

### 3 讨论

新近研究结果表明, 肿瘤的血管生成涉及到众多生长因子非均态样式的表达是实体瘤恶化进程的必要前提之一<sup>[18]</sup>。但是, 作为首先被发现的 VEGF 依然是通过抗血管途径来对恶性肿瘤开展基因治疗的重要靶点<sup>[19-20]</sup>。本研究旨在发展以核酶(ribozyme)家族中最为简单的锤头状核酶为介质的抑制 VEGF 基因表达的

载体系统, 期望在抗肿瘤的基因治疗中有所作为。

虑及肿瘤细胞中的 VEGF 必须被分泌到细胞外才能行使其功能, 而且 VEGF 至少存在五种以上不同的剪接形式<sup>[21]</sup>, 我们针对 VEGF 的信号肽(+1 到 +75 核苷酸)序列中符合在二级结构上暴露且 NUH 序列这两个要求的原理设计了 3 个核酶(Rz1: +8, Rz3: +36 和 Rz4: +71)(图 1)。为了判断 MFOLD 对靶 RNA 水平二级结构的分析信息对核酶设计的价值, 我们同时

设计了位于非暴露区位点的核酶 2(+17)(图 1)。为了克服核酶表达水平低、稳定性差和靶 RNA 及核酶间配对的可接触性等不利影响,我们将核酶基因克隆到 Lieber 的核酶表达的载体系统(pGVal)(图 2A-C)。同时我们还建立了 HA 肽标记的 VEGF 和萤火虫荧光色素酶融合蛋白的试管内和真核细胞中的表达系统(图 2),使对核酶切割效率的评估大大地便利化。通过引物延伸法,我们能够在序列水平上证实核酶 1,3,和 4 可在 VEGF RNA(VH)上预期的切点处切割,并以核酶 3 最为有效,而核酶 2 则无切割活性(图 3)。同样的结论也可从以 VHL 载体来源的靶 RNA 模板上,在 VEGF-LUC 融合蛋白水平上的分析结果中得出(萤火虫荧光色素酶活性,图 4A 和融合蛋白量,图 4B)。至此,我们已提供了针对 VEGF 121 RNA 二级结构暴露区 3 个核酶的酶切作用的序列特异性和有效性,而针对非暴露区则否的证据和结论。

然而, RNA 在细胞内从不以全裸的形式存在,从而有必要对这些核酶在细胞内的靶点特异性切割及其效率进行评价。通过瞬时共转染和荧光色素酶活性检测,我们发现仍是核酶 1,3 和 4 为有效(其中又以核酶 3 为最著),而核酶 2 无效(图 5A)。虑此实验转染效率远低于 20% 的局限性,我们进而表达各个核酶(1-4)和仅表达骨架建立了稳定表达核酶的 SMMC-7721 单克隆细胞株,并分别对核酶和内源性 VEGF RNA 的水平 PCR 方法进行定量。我们发现在该实验体系中,核酶 1,3 和 4 均可使 VEGF 的 RNA 降至近乎无法检出的水平;而核酶 2 虽其表达水平与其他 3 个核酶相当,但对 VEGF 的 RNA 量无任何可检出的影响(图 5B)。

总之,我们建立了一个有效抑制 VEGF 表达的锤头状核酶的载体系统(核酶 1,3 和 4),并表明 MFOLD 软件对靶 RNA 二级结构的预测是有效的实验评估前的理论准备。我们正努力建立肿瘤选择性高效表达核酶基因的腺病毒载体系统,继而在包括核瘤小鼠系统在内的实验体系中评估其有效性和安全性。另外,将核酶 1,3 和 4 的基因串连起来联合表达,可能进一步提高对 VEGF 表达抑制的效率。

致谢:对牛丹丹的建设性评论表示感谢。

## [参考文献]

[1] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1306-1309.

[2] Tammela T, Enholm B, Alitalo K, *et al.* The biology of vascular endothelial growth factors[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 550-563.

[3] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regula-

tion of angiogenesis[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(3): 794-814.

- [4] Dvorak HF, Brown L, Detmar M, *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(5): 1029-1039.
- [5] Salehi N, Bossone G, Veltri E, *et al.* Clinical experience with bevacizumab in colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(5): 3619-3623.
- [6] Ryan AJ, Wedge SR. ZD6474-a novel inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92 Suppl 1: S6-13.
- [7] Kwon HS, Shin HC, Kim JS. Suppression of vascular endothelial growth factor expression at the transcriptional and post-transcriptional levels[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8): e74.
- [8] Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(6): 468-479.
- [9] Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 217-223.
- [10] Muotri AR, da Veiga Pereira L, dos Reis Vasques L, *et al.* Ribozymes and the anti-gene therapy: How a catalytic RNA can be used to inhibit gene function[J]. *Gene*, 1999, 237(2): 303-310.
- [11] Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, *et al.* Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena[J]. *Cell*, 1982, 31(1): 147-157.
- [12] Phylactou LA, Kilpatrick MW, Wood MJ. Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease[J]. *Hum Mol Gene*, 1998, 7(10): 1649-1653.
- [13] Jiang WG, Grimshaw D, Lane J, *et al.* A hammerhead ribozyme suppresses expression of hepatocyte growth factor/scatter factor receptor c-MET and reduces migration and invasiveness of breast cancer Cells[J]. *Clinical Cancer Res*, 2001, 7(8): 2555-2562.
- [14] Lieber A, Strauss M. Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(1): 540-551.
- [15] Zuker M, Jacobson AB. Using reliability information to annotate RNA secondary structures[J]. *RNA*, 1998, 4(6): 669-679.
- [16] Shimayama T, Nishikawa S, Taira K. Generality of the NUX rule: Kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes[J]. *Biochemistry*, 1995, 34(11): 3649-3654.
- [17] Xu J, Zhu J, Ni M, *et al.* The ATF/CREB site is the key element for transcription of the human RNA methyltransferase like 1 (RNMTL1) gene, a newly discovered 17p13.3 gene[J]. *Cell Res*, 2002, 12(3-4): 177-197.
- [18] Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: A curse or cure[J]. *Postgrad Med J*, 2005, 81(954): 236-242.
- [19] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(5): 1011-1027.
- [20] Collins TS, Hurwitz HI. Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer[J]. *Semin Oncol*, 2005, 32(1): 61-68.
- [21] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(18): 11947-11954.

[收稿日期] 2005-07-10

[修回日期] 2005-08-08

[本文编辑] 韩丹