

[文章编号] 1007-385X(2005)03-

RNA 干扰抑制胃癌 VEGF 表达的实验研究

褚衍六¹, 赵幼安¹, 顾晓萌¹, 宋现让², 李文通³(1. 山东大学齐鲁医院, 济南 250012; 2. 山东省肿瘤医院, 济南 250117; 3. 山东大学医学院, 济南 250012)

在诸多促血管生成因子中, VEGF 的作用最强, 在肿瘤血管生成的各个环节均有重要作用, 且能特异性地作用于血管内皮细胞的有丝分裂原, 故抑制 VEGF 表达是当前抗肿瘤血管生成的最重要策略。本研究采用 DNA 载体细胞内表达小片段干扰 RNA 技术(small interfering RNA, siRNA), 构建干扰质粒 psiRNA-VEGF 并观察其抑制人胃腺癌细胞(MGC-803) VEGF 表达的效果。

1 材料与方法

1.1 psiRNA-VEGF 的构建

以 Ambion siRNA 靶序列分析设计系统, 扫描人 VEGF cDNA 编码序列(NM003376), 根据 siRNA 靶序列遴选设计原则^[1], 并经 BLAST 同源性分析后, 选择 3 条特异性 siRNA 靶序列, 设计其相应的双链 DNA(图 1)。psiRNA-VEGF1(1146-1164)上游序列为: 5'GATCC CCTCATCACGAAGTGGTGAAG**TAGAGC**CTTCA CCACT-TCGTGATGATTTTGA 3', 下游序列为 5'**AGCTT** TCAAAAATCATCACGAAGTGGTGAAG**GCTCTA** CTTCACTTCCGTGATGAG 3'; psiRNA-VEGF2(1341-1359)上游序列为: 5'GATCC CCCATCACCATG-CAGATTAT**TAGAGC**CATAATCTGCATGGTGTGTT TT TGA 3', 下游序列为: 5'**AGCTT** TCAAAAACAT CAC-CATGCAGATTAT**GCTCTA**CATAATCTGCATGGTGA TGG 3'; psiRNA-VEGF3(1654-1672)上游序列为: 5'GATCC CCCGTACTTGCAGATGTGACAT**TAGAGC**CT GTCA-CATC TGCAAGTACGTTTTTGA 3', 下游序列为: 5'**AGCTT** TCAAAAAACGTACTTGCAGATGT GACAG**GCTC-TAT**GTGCACATCTGCAAGTACGG 3'。单链 DNA 均为 59 nt, 5'端和 3'端分别含有 Bgl II 与 Hind III 的酶切位点(斜体部分), 5'端 19 nt 编码 siRNA 正义链即靶序列, 中间 6nt(粗体部分)转录后形成发卡结构, 3'端 19 nt 与 5'端 19 nt 反向重复, 编码 siRNA 反义链, TTTTT 为转录终止信号。化学合成各单链 DNA 片段后退火得到双链 DNA, 定向克隆至 Bgl II 和 Hind III 双酶切的空质粒 pSUPER, 得到 psiRNA-VEGF1, psiRNA-VEGF2, psiRNA-VEGF3。转化大肠杆菌 JM 109, 氨苄青霉素抗

性筛选, 阳性克隆酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后, 送上海生工测序鉴定。

图 1 siRNA 模板 DNA 设计示意图

1.2 质粒转染

采用脂质体转染法(Lipofectamine 2000, 美国 Invitrogen 公司), A 组 psiRNA-VEGF1, B 组 psiRNA-VEGF2, C 组 psiRNA-VEGF3, D 组 pSUPER, E 组阴性对照组。转染前 24 h, 换取新鲜培养液, 以 2×10^5 /孔接种 MGC-803 细胞于 6 孔培养板, 待细胞增至约 50% 时, 转染质粒-脂质体复合物, 37℃、5% CO₂ 条件下在无血清、无抗生素的培养液中培养 12 h 后换为含 10% 小牛血清的培养基, 继续培养 12 h 后进行 RNAi 抑制 VEGF 表达效果的检测。

1.3 Real Time PCR

按 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明一步法提取 MGC-803 细胞总 RNA。采用 20 μl 逆转录体系逆转录合成 cDNA: MgCl₂(25 mmol/L) 4 μl, 10 × 逆转录缓冲液 2 μl, dNTP 混合物(10 mmol/L) 2 μl, 重组的 RNasin[®]核糖核酸酶抑制剂 0.5 μl, 逆转录酶 AMV 15 U, Oligo(dT)₁₅引物 0.5 μg, 总 RNA 1 μg; 42℃ 60 min, 95℃ 5 min, 4℃ 5 min 灭活逆转录酶。Real Time PCR 试剂盒为 SYBR[®]Premix Ex Taq[™](大连宝生物), Real Time PCR 扩增仪为 ABI PRISM 7700 Sequence Detec-

[通讯作者] 赵幼安, E-mail: youanzhao@ yahoo. com. cn

tion SystemTM(美国 ABI); VEGF 上游引物为 AACCAT-GAACTTTCTGCTGCTTTG, 下游引物为 TTCACCACT-TCGTGATGATTCTG^[2], 扩增片段为 129 bp。采用 25 μ l 反应体系: SYBR[®] Premix Ex TaqTM(2 $\times$) 12.5 μ l, PCR Forward Primer(10 μ mol/L) 0.5 μ l, PCR Reverse Primer(10 μ mol/L) 0.5 μ l, ROX Reference Dye(50 $\times$) 0.5 μ l, 模板(cDNA 溶液) 2.0 μ l, dH₂O 9.0 μ l; 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环。根据标准定量曲线进行 PCR 产物的定量分析。

1.4 ELISA

按照人 VEGF ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)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。

2 结果与讨论

干扰质粒 psiRNA-VEGF 的 Bgl II 酶切位点丢失, 但可被 Hind III 酶切, 以此初步筛选阳性质粒, 如图 2 所示, psiRNA-VEGF1 的阳性克隆为 D, E, F, 进一步 DNA 测序证明干扰质粒构建成功。psiRNA-VEGF2, psiRNA-VEGF3 的鉴定同上。psiRNA-VEGF 转染胃腺癌细胞后 A, B, C 3 组 VEGF mRNA 水平较 E 组分别下降了 62.1%, 30.3%, 16.7%, 培养液上清 VEGF 浓度相应分别下降了 70.8%, 36.5%, 21.2%, D 组无明显变化。

图 2 干扰质粒 psiRNA-VEGF 阳性克隆的电泳筛选与鉴定

M: Marker; A, B, C, D, E, F: 未酶切; a, b, c, d, e, f: 前述质粒被 Bgl II 酶切后; f: 质粒 F 被 Hind III 酶切后

实验结果表明 RNAi 抑制 VEGF 表达效果显著, 其

中以 psiRNA-VEGF1 最为明显, 但稍低于国外文献的报道: Takei 等化学合成 siRNA-VEGF 抑制人前列腺癌细胞的 VEGF 基因, VEGF mRNA 降低达 88.6%, 培养液上清 VEGF 浓度相应降低了 98.7%^[3]。本实验采用 DNA 载体细胞内表达 siRNA, 该方法对靶基因的抑制率与化学合成的 siRNA 相似, 且可在细胞内较长期稳定表达 siRNA, 并可降低甚至杜绝核酸酶的污染。因此考虑本实验 VEGF 最高抑制率低于国外文献报道, 可能与 siRNA 靶序列的选择有关: 目前 siRNA 靶序列的遴选设计原则尚不成熟, 靶序列的选择仍然具有很大的随机性, 其改善尚待对 RNA 干扰机制的深入探讨。

肿瘤细胞旁分泌促血管生成因子促进血管内皮细胞的增殖与管腔化, 是肿瘤血管生成的关键环节, 因此抑制促血管生成因子的表达, 阻断肿瘤细胞作用血管内皮细胞的桥梁、减缓血管内皮细胞的分裂增殖, 成为抗血管生成治疗肿瘤的理论基础。RNA 干扰为双链 RNA 依赖的基因转录后沉默, 作为一种全新的基因沉默技术, 具有高特异性、高效性、传递性以及时间剂量依赖性等特点, 可同时抑制多个不同基因, 而且抑制效果互不干扰, 这为抗血管生成治疗肿瘤的进一步研究开辟了新的方向。

[关键词] RNA 干扰; VEGF; siRNA; 胃腺癌

[中图分类号] R730.54

[文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200.
- [2] Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, et al. Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303(4): 1169-1178.
- [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.

[收稿日期] 2005-01-20

[修回日期] 2005-04-10

[本文编辑] 韩丹