

· 论 著 ·

腺病毒介导 RNA 干扰抑制人结肠癌 VEGF 受体表达及肿瘤生长

王卫星,毛燕君,杨继金* (第二军医大学长海医院放射科,上海 200433)

[摘要] **目的:**观察腺病毒介导的 RNA 干扰抑制人结肠癌中血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR)表达及肿瘤生长的作用。**方法:**将 RNA 干扰 pAd-Easy/VEGFR 腺病毒载体用 Lipofectamine 2000 转染 293 细胞,制备携带人 VEGFR 的腺病毒,转染 CW2 细胞,通过荧光显微镜和流式细胞仪观察转染效率,通过 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测 VEGFR mRNA 的表达;以 MTT 比色法测定活细胞数并绘制细胞生长曲线。同时,制备裸鼠 CW2 细胞移植瘤模型,注射腺病毒后,每天观察肿瘤生长情况。应用免疫组化法检测微血管密度(MVD)。**结果:**pAd-Easy/VEGFR 重组腺病毒成功构建,转染效率为 99.7%。RT-PCR、Western 印迹实验结果显示转染 pAd-Easy/VEGFR 后,VEGFR 的表达明显被抑制。细胞生长曲线表明,重组载体转染后细胞生长明显减缓。体内实验表明,pAd-Easy/VEGFR 治疗后肿瘤生长慢并伴有较低的 MVD。**结论:**pAd-Easy/VEGFR 介导的 VEGFR shRNA 能有效抑制 CW2 细胞中 VEGFR 的表达,并能抑制肿瘤生长。

[关键词] 结肠肿瘤;RNA 干扰;血管内皮生长因子;腺病毒介导

[中图分类号] R 735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)10-1109-04

Adenovirus vector-mediated RNA interference inhibits expression of vascular endothelial growth factor receptor in colon carcinoma cells and tumor growth

WANG Wei-xing, MAO Yan-jun, YANG Ji-jin* (Department of Radiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the inhibitory effects of an adenovirus (Ad)-based short hairpin RNA (shRNA) expression system on expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and on growth of colon carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** RNA interference pAd-Easy/VEGFR vector was used to transfect 293 cells *via* Lipofectamine 2000. The adenoviral vector carrying VEGFR was used to transfect CW2 cells and the transfection efficiency was determined by fluorescent microscope and flow cytometry. The expression of VEGFR was examined by RT-PCR and Western blotting. The cell growth was observed with MTT method and the growth curve was plotted. Nude mouse was transplanted with CW2 cells to establish colon cancer tumor model and the growth of tumor was observed daily. Micro-vessel density (MVD) was detected by immunohistochemistry. **Results:** The recombinant pAd-Easy carrying shRNA against VEGFR was verified by sequencing. Flow cytometry showed that the transfection efficiency of CW2 cells was 99.7%. RT-PCR and Western blotting showed that the expression of VEGFR in pAd-Easy/VEGFR group was obviously decreased. The growth curve showed that the cell growth in the pAd-Easy/VEGFR group was obviously slowed down. We also found that the tumor growth in the nude mouse model was obviously inhibited and the MVD was also decreased. **Conclusion:** pAd-Easy/VEGFR-mediated VEGFR shRNA can effectively inhibit the expression of VEGFR in CW2 cells and suppress tumor growth *in vivo*.

[KEY WORDS] colon neoplasms; RNA interference; vascular endothelial growth factors; adenovirus-mediated

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(10):1109-1112]

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。新近的研究^[1]表明,VEGF 除可以促进肿瘤血管再生外,尚能通过肿瘤细胞表面 VEGF 受体(VEGFR)作用于肿瘤细胞本身,促进细胞的分裂增殖,抑制肿瘤细胞的凋亡,即 VEGF 是肿瘤细胞分泌的生长因子。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)诱发的特定基因沉默,基于此的 RNAi 技术在基因功能研究以及肿瘤等疾病的基因

治疗中具有广阔的应用前景^[2]。本研究用 pAd-Easy/VEGFR 腺病毒 RNA 干扰载体系统制备携带人 VEGFR 的腺病毒,以此转染人结肠癌 CW2 细胞株,通过体内外实验观察其所产生的 RNA 干扰效应及其对结肠癌细胞生长的抑制作用,探索结肠癌基因治疗新的有效方法。

[基金项目] 国家自然科学基金(C03030304)。Supported by National Natural Science Foundation of China(C03030304)。

[作者简介] 王卫星,硕士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: xxwkdairly@163.com

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 α 、真核表达载体质粒 pRNA-H1、穿梭质粒 pShuttle、腺病毒 siRNA 表达载体 pAd-Easy 质粒由中国人民解放军胸心外科研究所保存,人胚肾 293 细胞和人结肠癌细胞系 CW2 购自中国科学院上海细胞生物研究所。限制性内切酶、T₄ 连接酶购自美国 Promega 公司,RT-PCR 试剂盒为大连 TaKaRa 生物公司产品;DL2000 核酸相对分子质量标准、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;脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自美国 Gibco 公司;DMEM 高糖培养基、标准小牛血清购自美国 Hyclone 公司。hVEGFR ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.2 抑制 VEGFR 基因表达的 shRNA 腺病毒表达载体的构建 pAd-Easy/VEGFR 腺病毒 RNA 干扰粘粒的构建和鉴定已由中国人民解放军胸心外科研究所完成并经测序鉴定正确^[2]。

1.3 携带 VEGFR 重组腺病毒的制备 转染前 1 d 将人胚肾 293 细胞消化重悬,以铺满 25 cm² 培养瓶底部 90% 的密度接种培养;转染前 4 h 将酶切纯化的重组粘粒 pAd-Easy/VEGFR 加 500 μ l Opti-ME-MI,混匀,室温放置 5 min;将 20 μ l 脂质体 Lipofectamine 2000 加入到另一含 500 μ l Opti-MEMI 离心管中充分混匀,室温 5 min。将 500 μ l Lipofectamine 2000/Opti-MEMI 混合液加入到 500 μ l pAd-Easy/VEGFR/Opti-MEMI 混合液中,充分混匀,室温放置 20 min;将 1 ml 的脂质体、粘粒和培养液混合物加入到铺满 293 细胞的 25 cm² 培养瓶中,轻晃培养瓶使之均匀覆盖在 293 细胞层上;将转染的 25 cm² 培养瓶置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵箱中培养 24 h;转染细胞消化重悬后以 70% 的密度接种继续培养。转染 10 d 后观察到嗜菌斑现象,表明有腺病毒产生,继续培养至大部分细胞脱落,将细胞悬液转至无菌离心管内;室温,1 500 \times g 离心 5 min;将上清转至一清洁、消毒的锥形管内,37 $^{\circ}$ C/-80 $^{\circ}$ C 冻融 3 次;室温,5 000 \times g 离心 5 min;上清即第 1 代重组腺病毒液,分装储存于-80 $^{\circ}$ C 备用。用上清反复感染 293 细胞和 HeLa 细胞至第 4 代,筛选出单克隆病毒感染株后酶切鉴定,扩增提纯,测病毒滴度后保存于-80 $^{\circ}$ C 待用。

1.4 CW2 细胞培养和转染 CW2 细胞生长于含 10% 小牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养液中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的水饱

和条件下培养。实验分为空白对照组、pAd-Easy 组和 pAd-Easy/VEGFR 组 3 组,当细胞处于对数生长期时,腺病毒分别按 MOI=10、20、30、50、100 转染 CW2 细胞。转染 24 h 后流式细胞仪检测转染效率,并选取转染效率最高、细胞活性最强的 MOI=50 用于以下实验。

1.5 Western 印迹法检测 CW2 细胞中 VEGFR 的表达 收集对数生长期的 3 组细胞 1 \times 10⁶ 个,PBS 洗涤 2 遍,加入含 1 mmol/L PMSF (Merk, USA) 的细胞裂解液超声裂解细胞,提取总蛋白,紫外分光光度计法进行蛋白质定量。蛋白质上样量每泳道均为 100 μ g,进行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, Bio-Rad, USA),以蛋白质电泳转移仪(Bio-Rad, USA)将产物转至 NC 膜上,室温封闭 2 h,加入 1:1 000 兔抗人 VEGFR (Santa Cruz, USA),4 $^{\circ}$ C 反应过夜,PBS 洗膜,加入 1:4 000 羊抗兔 IgG/HRP,室温孵育 1.5 h,用化学发光试剂反应 5 min,发光成像仪摄像。

1.6 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测 pAd-Easy/VEGFR 对 CW2 细胞生长的影响 取对数生长期的细胞,胰酶消化,制成单个细胞悬液,计数细胞,以每孔 5 \times 10³ 个细胞接种于平底 96 孔板,分为 3 组。放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 18 h 后以 MOI=50 进行腺病毒转染。于转染后 24 h 行 MTT 检测。待测细胞每孔中加入 MTT 溶液 200 μ l,置于 5% CO₂、饱和湿度、37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 h,弃上清,加入 100 μ l 的 DMSO,室温下反复摇匀 15 min,在 Wellwash MK2 型酶标仪上读取 492 nm 的每孔光密度(D)值。每组细胞测 4 孔,取均值。连续检测 9 d 并绘制细胞生长曲线。

1.7 细胞周期测定 采用流式细胞仪测定细胞周期。细胞制备成单细胞悬液后,经 70% 乙醇-20 $^{\circ}$ C 固定过夜。与 PI 染色液(33 μ g/ml PI,0.13 mg/ml RNaseA,10 mmol/L EDTA,0.5% TritonX-100)室温孵育 30 min,以流式细胞仪检测 DNA-PI 的荧光强度。结果采用 Modit 软件系统进行分析。

1.8 集落形成试验 细胞制备成单细胞悬液后,接种于 6 cm 培养皿,接种密度为 300/皿,连续培养 14 d,培养皿经 95% 乙醇固定、Gemsa 染色后,记录含有 50 个细胞以上、直径>0.5 mm 的集落数量,分别计算集落存活分数和集落抑制率。集落存活分数=实验组集落形成率/对照组集落形成率;集落抑制率(%)=(1-实验组集落形成率/对照组集落形成率) \times 100%。

1.9 pAd-Easy/VEGFR 对 CW2 细胞裸鼠皮下移

植瘤生长的影响 BALB/c 裸鼠, 4~6 周龄 39 只, 雌雄不限, 平均体质量 20~23 g。由上海中国科学院动物培育中心提供, 第二军医大学实验动物中心清洁级动物实验室饲养。于裸鼠右背部皮下接种 0.2 ml CW2 细胞悬液, 即含有 2×10^6 个细胞, 7 d 后可见小结节, 生长比较迅速。2 周后对 27 只皮下肿瘤明显生长的裸鼠随机分为 4 组(每组 6~8 只), 即生理盐水对照组、肿瘤对照组、空病毒 pAd-Easy 组、pAd-Easy/VEGFR 治疗组。共注射 4 次, 每次注射间隔 1 周。4 周后, 处死裸鼠, 取肿瘤组织, 称瘤体质量, 用游标卡尺测量肿瘤大小, 根据公式: $V = ab^2/2$ (a 为长轴, b 为短轴) 计算肿瘤体积。

1.10 VEGF 表达和计数微血管密度(MVD) 运用免疫组化方法(EnVision 二步法)分析。一抗为鼠抗人的 CD34 1:50 (丹麦 DAKO 公司), VEGFR 1:50 (美国 Oncogene 公司)。MVD 检测: 染成棕色的单个血管内皮细胞或血管内皮细胞簇, 视为一个微血管。先用 40 倍光镜扫视整个切片, 寻找高血管密度区, 即“热点”, 然后在 200 倍视野下计数血管数目, 记录 3 个视野内的微血管数, 取其平均数作为该样品的 MVD。

1.11 统计学处理 实验结果采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 用方差分析比较各组间差别, 运用非参数统计中 Pearson 等级相关法对 MVD 与病理指标进行相关性检验。

2 结果

2.1 Western 印迹分析检测 VEGFR 表达 结果如图 1 所示, pAd-Easy/VEGFR 组细胞中 VEGFR 的表达与 pAd-Easy 空病毒组和空白对照组比较明显减弱。实验结果说明, 转染 VEGFR-shRNA 的表达载体后, VEGFR 基因的表达被明显抑制。

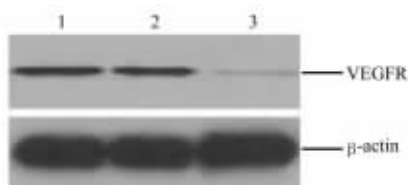


图 1 Western 印迹检测 CW2 细胞中 VEGFR 的表达

Fig 1 Western blot analysis of VEGFR protein expression in CW2 cells

1: pAd-Easy group; 2: Non-infected group; 3: pAd-Easy/VEGFR group

2.2 MTT 比色法检测 pAd-Easy/VEGFR 对 CW-2 细胞生长的影响 由生长曲线(图 2)可以看出 pAd-Easy/VEGFR 组细胞生长曲线较平缓, 细胞生

长速度较正常组降低。

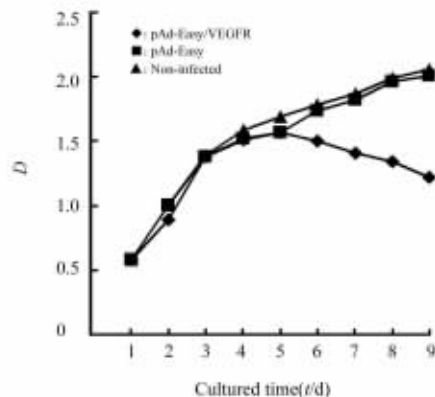


图 2 三组 CW2 细胞生长曲线

Fig 2 Cell growth of CW2 cells in 3 groups

2.3 细胞周期测定 CW2 细胞 pAd-VEGFR 组 G_0 - G_1 期细胞百分数较 CW2 对照组增加了 11.3%, 较 CW2 pAd 空病毒组增加了 9.5% ($P < 0.05$)。CW2 pAd-VEGFR 组进入 S 期的细胞百分数较 CW2 对照组减少了 7.3%, 较 CW2 pAd 空病毒组减少了 8.1% ($P < 0.05$)。 G_2 -M 期细胞百分数在各组之间无显著改变。

2.4 生长抑制试验 pAd-Easy/VEGFR 组集落存活分数比 CW2 对照组明显降低 (36.7% vs 85.2%, $P < 0.01$), 而集落抑制率明显增加 (63.3% vs 14.8%, $P < 0.01$); pAd-Easy 空白载体组与 A549 对照组相比集落存活分数和集落抑制率无明显差别。

2.5 pAd-Easy/VEGFR 对 CW2 细胞裸鼠皮下移植瘤生长及 MVD 的影响 动物接种后, 每 2 d 测量一次肿瘤最长径 a 值和最短径 b 值, 计算肿瘤体积, 具体见表 1。检验结果提示: pAd-Easy/VEGFR 治疗组可以显著抑制肿瘤生长和 MVD ($P < 0.05$), 其余各组之间无显著性差异。

3 讨论

众所周知, 肿瘤血管是肿瘤生长和转移的必要条件, 抑制肿瘤血管生成可阻止肿瘤的生长与转移。Bielenberg 等^[4]认为肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成, 其中 VEGF 是目前所知作用最强的促血管内皮生长的细胞因子。它能增加血管通透性, 促进肿瘤血管形成, 对肿瘤血管内皮细胞的增殖和迁移等发挥着重要作用^[5]。已有的研究结果已证实 VEGF 与结肠癌的增殖、浸润和转移密切相关^[5]。因此, 阻断或抑制 VEGF 在肿瘤组织中的表达可能对抑制肿瘤生长和转移有重要作用^[6]。

表 1 裸鼠 CW2 细胞移植瘤组织大小及体质量比较

Tab 1 Comparison of tumor size and weight in nude mice transplanted with CW2 cells

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Tumor size (V/mm ³)	Tumor weight(m/g)	MVD
pAd-Easy/VEGFR	8	426.73±176.48*	0.64±0.11*	16.03±3.78*
pAd-Easy	7	1 558.77±98.01	1.97±0.39	38.13±4.58
PBS	6	1 627.37±377.79	2.26±0.71	42.21±3.10
Control	6	1 795.32±211.74	2.51±0.52	40.22±5.10

* P<0.05 vs control group

RNAi 是一种比反义技术更为有效的靶向作用于目的基因的研究基因功能的新技术,少量的 dsRNA 分子就能完全抑制相应基因的表达,能在低于反义核酸几个数量级的浓度下研究目的基因^[7-8]。目前通过 siRNA 诱导哺乳动物细胞内 RNAi 的操作方法有两种,分别为化学合成的 siRNA 和细胞内表达的 siRNA。用化学合成法人工制备 siRNA,操作简单、快速,但引起的 RNA 干扰效应往往是暂时的,难以持久。因此,目前更倾向于在哺乳动物细胞内表达 siRNA,以维持长久的 RNA 干扰效应。细胞内表达法是将表达 siRNA 的载体转染细胞,在细胞内表达 siRNA。目前, RNA 干扰技术已经广泛用于抗肿瘤新生的实验研究中,但是转染效率一直是基因转染技术的热点和难点。目前认为腺病毒载体是肿瘤基因治疗的理想载体,具有多种优点:无遗传毒性;可高效感染各种组织的分裂及不分裂细胞,尤其能感染分裂期的细胞;不整合到宿主细胞的 DNA 中^[9]。本实验所采用的是 pAd-Easy 腺病毒表达系统,它具有穿梭质粒和腺病毒骨架质粒两个部分,这两个部分可以在真核细胞中发生重组。和脂质体转染技术相比,具有稳定、高效、低毒的特点,并且转染效率可达 90% 以上,远远大于其他的转染方法。同时,由于载体的存在,和原先的直接转染 siRNA 相比,此方法所引起的 RNAi 现象更持久、稳定,可用于体内长期治疗,这在本实验的体内研究中得到进一步的证实。

本实验中,RT-PCR 和 Western 印迹实验结果显示,pAd-Easy/VEGFR 组 VEGFR 表达水平明显降低,表明 RNAi 不仅抑制人结肠癌细胞 CW2 中 VEGFR 基因的表达,还可以进一步抑制 VEGFR 蛋白的表达。通过观察细胞的生物学性状发现,pAd-Easy/VEGFR 组细胞生长减慢,细胞生长曲线较平缓,细胞周期也发生了变化,显示该组细胞的生物学性状已发生明显改变。对 CW2 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响提示 pAd-Easy/VEGFR 治疗组可以显著抑制肿瘤生长,而另一方面,MVD 实验结

果提示干扰 VEGFR 的表达,还可以抑制肿瘤血管的生成,从而达到治疗的目的。

综上所述,dsRNA-VEGFR 可有效抑制 CW2 细胞 VEGFR 表达,抑制细胞增生,在体实验提示可以显著抑制肿瘤生长。因此, RNAi 技术能有效用于结肠癌的基因治疗,本研究为进一步应用 RNAi 技术开展对肿瘤的基因治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Slongo M L, Molena B, Brunati A M, et al. Functional VEGF and VEGF receptors are expressed in human medulloblastomas [J]. Neuro Oncol, 2007, 9: 384-392.
- [2] 李白翎, 侯霄雷, 张冠鑫, 等. 血管内皮细胞生长因子 RNA 干扰真核表达载体的构建 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17: 679-682.
- [3] 许文林, 沈慧玲, 袁伟, 等. 血管内皮细胞生长因子受体短发夹环 RNA 真核表达载体的构建 [J]. 苏州大学学报(医学版), 2004, 24: 479-483.
- [4] Bielenberg D R, Klagsbrun M. Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins [J/OL]. Cancer Metastasis Rev [2007-09-01].
- [5] Waisbourd M, Loewenstein A, Goldstein M, et al. Targeting vascular endothelial growth factor: a promising strategy for treating age-related macular degeneration [J]. Drugs Aging, 2007, 24: 643-662.
- [6] Hong X, Jiang F, Kalkanis S N, et al. Decrease of endogenous vascular endothelial growth factor may not affect glioma cell proliferation and invasion [J]. J Exp Ther Oncol, 2007, 6: 219-229.
- [7] Yano S, Herbst R S, Shinohara H, et al. Treatment for malignant pleural effusion of human lung adenocarcinoma by inhibition of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase phosphorylation [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 957-965.
- [8] 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: 494-498.
- [9] Gupta S, Schoer R A, Egan J E, et al. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 1927-1932.

[收稿日期] 2007-07-18

[修回日期] 2007-09-07

[本文编辑] 尹 荼