

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01153

RNA 干扰血管内皮生长因子受体表达对人肺腺癌细胞的抑制作用

张冠鑫¹, 侯霄雷², 李白翎^{1*}, 黄盛东¹

1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 ICU, 上海 200437

[摘要] 目的: 观察人血管内皮生长因子受体(VEGFR)RNA 干扰重组腺病毒(Ad-VEGFR^{shRNA})对人肺腺癌细胞株 A549 生长的抑制作用。方法: 制备携带人 VEGFR 的 RNA 干扰重组腺病毒, 转染 A549 细胞, 通过荧光显微镜观察转染效率。应用 Western 印迹法检测 A549 细胞 VEGFR 蛋白的表达, MTT 比色法测定活细胞数并绘制细胞生长曲线, 细胞周期及集落形成试验测定细胞生长抑制情况。同时, 制备裸鼠 A549 细胞移植瘤模型, 观察肿瘤生长情况。结果: Western 印迹法显示 RNA 干扰组 VEGFR 表达水平明显降低; 细胞生长曲线表明, RNA 干扰后细胞生长明显减缓; 细胞周期及集落形成试验提示 RNA 干扰后肿瘤细胞生长受到明显抑制。裸鼠皮下移植瘤生长情况提示 RNA 干扰可以显著抑制肿瘤生长。结论: RNA 干扰重组腺病毒 Ad-VEGFR^{shRNA} 能有效抑制 A549 细胞中 VEGFR 的表达, 并能抑制肿瘤生长。

[关键词] RNA 干扰; 血管内皮生长因子受体; 腺病毒; 肺腺癌细胞

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)10-1153-04

Vascular endothelial growth factor receptor targeted RNA interference inhibits growth of human lung adenocarcinoma cells

ZHANG Guan-xin¹, HOU Xiao-lei², LI Bai-ling^{1*}, HUANG Sheng-dong¹

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of ICU, Yueyang Hospital of Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of RNA silencing *via* adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) shRNA on proliferation of lung adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Ad-VEGFR^{shRNA} adenovirus containing enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene and VEGFR^{shRNA} was constructed and was used to infect A549 cells; fluorescent microscopy was used to observe the infection efficiency. Western blotting assay was used to examine the expression of VEGFR protein in A549 cells. MTT method was used to examine the cell viability and the cell growth curve was drawn. The inhibition of cell growth was examined by cell cycle and colony-forming test. Meanwhile, nude mice were transplanted with A549 cells to establish tumor-bearing model, and the long term growth of tumor was observed. **Results:** Western blotting revealed that the expression of VEGFR was obviously decreased in the RNA interference group. The cell growth curve indicated that the cell growth was obviously inhibited after RNA interference. Cell cycle and colony-forming test indicated that the tumor growth was obviously inhibited after RNA interference. *In vivo* study with nude mice also indicated that RNA interference obviously inhibited tumor growth. **Conclusion:** The constructed VEGFR-targeted shRNA can effectively inhibit VEGFR expression in A549 cells and can suppress the growth of A549 cells.

[KEY WORDS] RNA interference; vascular endothelial growth factor receptor; adenovirus; lung adenocarcinoma cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1153-1156]

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。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

[收稿日期] 2008-01-31 **[接受日期]** 2008-04-01

[基金项目] 上海市科委重点项目(04JC14006), Supported by Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(04JC14006).

[作者简介] 张冠鑫, 硕士.

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: smmu-libailing@yahoo.com.cn

凋亡。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^[1]。本研究用pAd-Easy腺病毒RNA干扰载体系统制备携带人VEGFR的重组腺病毒Ad-VEGFR^{shRNA},以此转染人肺腺癌A549细胞株,通过体内外实验观察其所产生的RNA干扰效应对肺腺癌细胞生长的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 腺病毒siRNA表达载体pAd-Easy质粒由解放军胸心外科研究所保存,人胚肾293细胞(HEK293)、HeLa细胞及人肺腺癌细胞系A549购自中科院上海细胞生物研究所。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。

1.2 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解放军胸心外科研究所构建完成,经测序鉴定完全符合文献报道序列^[2]。

1.3 携带VEGFR重组腺病毒Ad-VEGFR^{shRNA}的制备 转染前1 d将HEK293细胞消化重悬,转染前4 h将酶切纯化的重组粘粒pAd-Easy/VEGFR加500 μ l Opti-MEMI,混匀,室温放置5 min;将500 μ l Lipofectamine/Opti-MEMI混合液加入到500 μ l pAd-Easy/VEGFR/Opti-MEMI混合液中,充分混匀,加入到铺满HEK293细胞25 cm²培养瓶中,轻晃培养瓶使之均匀覆盖在HEK293细胞层上。转染10 d后观察到CPE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,其上清即第1代重组腺病毒液。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℃备用。

1.4 A549细胞转染效率检测 实验分为空白对照组、Ad-null组和Ad-VEGFR^{shRNA} RNA干扰组3组。当细胞处于对数生长期时,根据前期研究分别用腺病毒转染A549细胞,其中MOI=50。由于pAd-Easy系统带有绿色荧光蛋白(EGFP),转染24 h后用荧光显微镜观察EGFP的表达并用流式细胞仪检测转染效率。

1.5 Western印迹分析检测VEGFR表达 收集对数生长期的3组细胞,PBS洗涤2次,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。行12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, 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℃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,发光成像仪取像。

1.6 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测Ad-VEGFR^{shRNA}对A549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 5×10^3 个细胞接种于平底96孔板,分为3组。放置于37℃,5% CO₂培养箱中培养18 h后以MOI50进行腺病毒转染。于转染后24 h行MTT检测。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℃固定过夜。与PI染色液室温孵育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、姬姆萨染色后,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=试验组集落形成率/对照组集落形成率;集落抑制率(%)=(1-试验组集落形成率/对照组集落形成率)×100%。

1.9 Ad-VEGFR^{shRNA}对A549细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响 BALB/c裸鼠,4~6周龄27只,雌雄兼有,体质量20~23 g。由上海中科院实验动物中心提供,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 A549细胞悬液,即含有 2×10^7 个细胞,7 d后可见小结节,生长比较迅速。裸鼠随机分为4组,即生理盐水对照组、肿瘤对照组、Ad-null组、Ad-VEGFR^{shRNA}干扰组。每次注射给药100 μ l,共给药4次,每次间隔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: $V = a \times b^2 / 2$ (a为长轴,b为短轴)计算肿瘤体积。

1.10 统计学处理 实验结果应用SPSS 12.0统计软件包完成,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分类变量用 χ^2 检验,连续变量采用方差分析。

2 结果

2.1 Ad-VEGFR^{shRNA}重组腺病毒感染效率检测 由图1可见,MOI=50时Ad-VEGFR^{shRNA}重组腺病

毒可以高效感染 A549 细胞, 进一步用流式细胞仪细胞计数提示转染效率为 82.7%, 说明转染细胞可以用于后续实验。

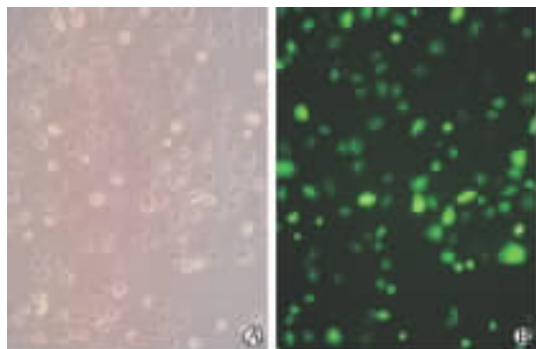


图 1 24 h 后 Ad-VEGFR^{shRNA} 感染 A549 肺癌细胞效率检测

Fig 1 Efficiency of Ad-VEGFR^{shRNA} infecting lung adenocarcinoma cell A549 24 h later

A: By light microscope; B: By fluorescent microscope. Original magnification: $\times 200$

2.2 Western 印迹法检测 VEGFR 表达 转染 Ad-VEGFR^{shRNA} 重组腺病毒后, VEGFR 基因的表达被明显抑制(图 2)。

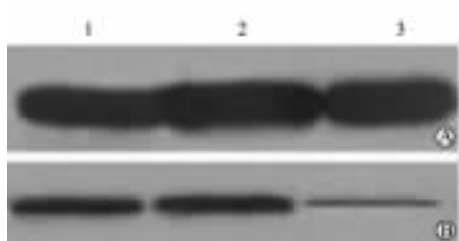


图 2 Western 印迹检测 A549 细胞中 VEGFR 的表达
Fig 2 Western blotting analysis of VEGFR protein in A549 cells

A: β -actin; B: VEGFR. 1: Ad-null group; 2: Non-infected group; 3: Ad-VEGFR^{shRNA} group

2.3 MTT 比色法检测 Ad-VEGFR^{shRNA} 对 A549 细胞生长的影响 由细胞生长曲线可以看出 RNA 干扰组细胞生长曲线较平缓, 细胞生长速度较对照组明显降低($P < 0.01$, 图 3)。

2.4 细胞周期测定 Ad-null 组与对照组相比细胞生长无明显差别($P > 0.05$); RNA 干扰组 G₀-G₁ 期细胞百分数较对照组增加了 11.3%, 较 Ad-null 空病毒组增加了 9.5% ($P < 0.01$); RNA 干扰组进入 S 期的细胞百分数较对照组减少了 7.3%, 较 Ad-null 空病毒组减少了 8.1% ($P < 0.01$)。G₂-M 期细胞百分数在各组之间无显著改变(图 4)。

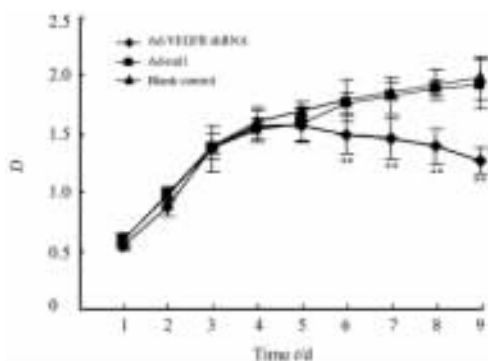


图 3 三组 A549 细胞生长曲线

Fig 3 Growth curve of A549 cells in 3 groups

** $P < 0.01$ vs blank control

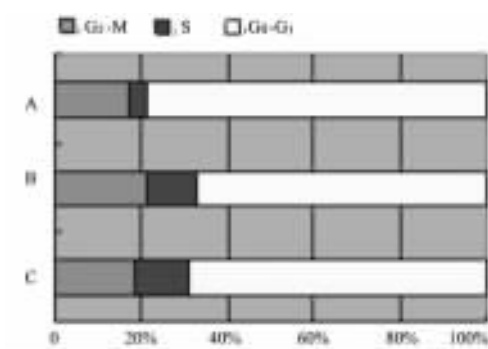


图 4 细胞周期测定结果

Fig 4 Cell cycle determination results

A: Ad-VEGFR^{shRNA} group; B: Ad-null group; C: Non-infected group

2.5 生长抑制试验 RNA 干扰组细胞计数 $(6 \pm 1) \times 10^4$, 集落计数 87 ± 11 ; Ad-null 组细胞计数 $(21 \pm 3) \times 10^4$, 集落计数 202 ± 10 ; 对照组细胞计数 $(23 \pm 4) \times 10^4$, 集落计数 237 ± 8 。统计学分析表明, RNA 干扰组细胞生长受到明显抑制($P < 0.01$), Ad-null 组与对照组相比细胞生长无明显差别。

2.6 RNA 干扰对 A549 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响 结果如表 1 所示, Ad-VEGFR^{shRNA} RNA 干扰组可以显著抑制肿瘤生长($P < 0.01$), 其余各组之间无显著性差异。

表 1 裸鼠 A549 细胞移植瘤组织大小及质量比较

Tab 1 Comparison of tumor size and weight in nude mice transplanted with A549 cells

Group	n	Volume V/mm ³	Weight m/g
Ad-VEGFR ^{shRNA}	8	426.73 \pm 176.48**	0.64 \pm 0.11**
Ad-null	7	1 558.77 \pm 98.01	1.97 \pm 0.39
PBS	6	1 627.37 \pm 377.79	2.26 \pm 0.71
A549	6	1 795.32 \pm 211.74	2.51 \pm 0.52

** $P < 0.01$ vs A549 group

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。Folkman^[3]依据大量的实验证据,提出肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成。以后相继发现并分离了多种促进血管形成的调控因子。VEGF是目前所知作用最强的促血管内皮生长的细胞因子。它能特异作用于血管内皮细胞,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^[4]。非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)的恶性程度高,早期即可出现广泛转移,预后差,已有研究结果证实 VEGF 与 NSCLC 的发生、发展、转移和预后密切相关^[5]。NSCLC 患者血中 VEGFR 表达可预示 NSCLC 患者的生存率。因此,阻断或抑制 VEGFR 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]。

RNA 干扰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]。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。腺病毒载体目前被认为是肿瘤基因治疗的理想载体^[8]。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。本实验采用的 pRNA-H1 真核表达载体包含了一个 polyase III 启动子 H1。在这个启动子的控制下可以转录出没有 Poly A 的 RNA,按照实验者的设计在体内形成 shRNA 行使 RNA 干扰作用。体外、在体研究均证实 polyase III 启动子可在多种细胞中抑制靶基因的表达,具有良好的细胞及组织特异性,从而成为 shRNA 更理想的技术方案^[9]。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^[10]。在我们设计的实验中,从 VEGFR mRNA 中筛选出了专一靶向作用序列,并将 H1 控制的整个表达框通过基因重组的方法插入穿梭质粒中,获得重组腺病毒用于转染,干扰 VEGFR 的表达。Western 印迹结果显示, RNA 干扰组 VEGFR 蛋白

表达水平明显降低,表明 RNAi 可使肺腺癌细胞 A549 中 VEGFR 的表达受到显著抑制。通过观察细胞的生物学性状发现, RNA 干扰组细胞生长减慢,细胞生长曲线较平缓;显示该组细胞的生物学性状已发生明显改变。观察裸鼠皮下移植瘤生长情况提示 RNA 干扰组可以显著抑制肿瘤生长,说明 Ad-VEGFR^{shRNA} 可特异、有效地降低肿瘤细胞 VEGFR 基因的表达,进一步抑制肿瘤血管生成从而达到治疗肿瘤的目的。

综上所述,本研究发现 Ad-VEGFR^{shRNA} 可有效抑制 A549 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,为进一步应用 RNAi 技术开展对肺腺癌的基因治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 唐 霓,黄爱龙,张秉强,闫 歌, Tong-Chuan He. 应用 RNA 干扰技术抑制乙型肝炎病毒抗原表达的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 83: 1309-1312.
- [2] 许文林,沈慧玲,袁 伟,江云伟,阮长歌. 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.
- [3] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285: 1182-1186.
- [4] Rowe P M. Starve the tumor, save the patient [J]. Lancet, 1997, 349: 1058.
- [5] Takahama M, Tsutsumi M, Tsujiuchi T. The expression of vascular endothelial growth factor in lung cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2001, 31: 176-181.
- [6] Yano S, Herbst R S, Shinohara H, Knighton B, Bucana C D, Killion J J, 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.
- [7] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411: 494-498.
- [8] Caplen N J, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan R A. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2001, 98: 9742-9747.
- [9] Bui L A, Butterfield L H, Kim J Y, Ribas A, Seu P, Lau R, et al. *In vivo* therapy of hepatocellular carcinoma with a tumor specific adenoviral vector expressing interleukin-2 [J]. Hum Gene Ther, 1997, 8: 775-800.
- [10] Gupta S, Schoer R A, Egan J E, Hannon G J, Mittal V. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 1927-1932.

[本文编辑] 孙 岩