

# 腺病毒介导的 RNA 干扰降低 VEGF 转录抑制血管形成的研究

许剑锋, 沈维干, 彭琬昕, 李朝军

(南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 用细菌内同源重组的方法构建了针对 VEGF 的 siRNA 表达重组腺病毒 AdH1-sRNA/VEGF, 感染 HUVEC 细胞, 观察该病毒对 HUVEC 细胞体外增殖和形成微血管的干扰作用。通过 Real-time RT-PCR 实验表明, AdH1-sRNA/VEGF 可特异性地下调血管内皮细胞 (HUVEC) 中的 VEGF mRNA 水平。与对照组相比, VEGF 的 mRNA 水平下降为 50%, AdH1-sRNA/VEGF 对 HUVEC 细胞增殖有干扰作用。加入病毒 9 d 后, 对照组的细胞平均计数为  $31.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ , 干扰病毒对照组为  $28 \times 10^4 / \mu\text{L}$ , AdH1-sRNA/VEGF 干扰组为  $21.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 。AdH1-sRNA/VEGF 对 HUVEC 细胞在 Matrigel 上形成微血管有干扰作用, 对照组每 HPF 形成微血管数量为 10.75 条, 干扰病毒对照组为 10.25 条, 实验组 AdH1-sRNA/VEGF 每 HPF 形成微血管数量为 7 条。证明 AdH1-sRNA/VEGF 可以干扰血管形成。

[关键词] 血管生成, 血管内皮生长因子, RNA 干扰

[中图分类号] Q291 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1292(2007)04-0084-04

## Study on Inhibition of the Tube Formation by RNA Introduced by Adenovirus by its Interference With and Decrease of VEGF Transcription

Xu Jianfeng, Shen Weigan, Peng Wanxin, Li Chaojun

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract** This study uses the homologous recombination technique to construct a recombinant adenovirus AdH1-sRNA/VEGF targeting VEGF, infects human endothelial cells (HUVEC), observes the interference of the adenovirus with the proliferation of HUVEC in vitro and the tube formation. The experiment of real-time reverse transcription-PCR shows that this adenovirus can especially decrease level of the VEGF mRNA of HUVEC. Compared with control group, the mRNA expression of VEGF decreased to 50%. AdH1-sRNA/VEGF can efficiently interfere the proliferation of HUVEC. Nine days after infection of adenovirus, the average cell number of control group and vector group are  $31.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$  and  $28 \times 10^4 / \mu\text{L}$  respectively, that of groups respectively infected with AdH1-sRNA/VEGF are  $21.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ , and can efficiently interfere the tube formation of HUVEC on Matrigel. Averagely, the tube number of every HPF is 10.75 in the control group, and 10.25 in the vector group. In the group treated with AdH1-sRNA/VEGF, there are 7 tubes in the HPE. AdH1-sRNA/VEGF can interfere tube formation.

**Key words** angiogenesis, VEGF, RNAi

## 0 引言

血管新生对于肿瘤的生长、浸润和转移过程是十分重要的。肿瘤依靠新生血管来提供营养 (包括氧气) 和排泄废物, 转移灶的形成和发展也依赖于新生血管的形成。临床研究显示, 肿瘤诱导血管新生的能力决定了其生长和转移的能力。如能有效抑制血管生成、切断肿瘤血供, 有望达到抑制肿瘤生长、发展和转移的目的。

绝大多数恶性肿瘤中, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 呈高表达, 形成旁/自分泌作用方式, 促进内皮细胞分裂、增殖, 诱导血管新生, 并直接作用于肿瘤细胞刺激其生长<sup>[1]</sup>。VEGF

收稿日期: 2007-09-07

作者简介: 许剑锋 (1964-), 硕士, 主要从事分子生物学方面的学习与研究。E-mail: xj64656@sina.com

通讯联系人: 李朝军 (1966-), 研究员, 博士生导师, 主要从事细胞生物学方面的教学与研究。E-mail: Chaojun.L@Yahoo.com

在一些恶性肿瘤(包括胃癌、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和脑癌等)中表达水平显著增高,并与肿瘤的微血管密度、恶性程度以及转移密切相关。下调 VEGF 表达可能会抑制血管形成,进而减缓肿瘤的生长和浸润。

VEGF 也被称为血管透性因子,在体外是一种高度特异性地促内皮细胞分裂原,在体内是一类促进血管新生的血管生长因子,于 20 世纪 80 年代从牛脑垂体滤泡星状细胞体外培养液中分离、提纯<sup>[2]</sup>。血管内皮细胞和周细胞均可产生较低水平的 VEGF。其主要生物学功能为:

(1)选择性增强血管内皮细胞有丝分裂,刺激内皮细胞增殖并促进血管形成;(2)升高血管尤其是微小血管的渗透性,使血浆大分子外渗沉积在血管外的基质中,为新生毛细血管网的建立提供营养。VEGF 相对分子量为 34 000~45 000,序列高度保守,其糖蛋白单体以二硫键结合成二聚体才具备生物活性。人类 VEGF 基因定位于(6P21.3),是由 8 个外显子和 7 个内含子组成,全长 14 000 bp。现有的研究显示,VEGF 在人类的肿瘤血管新生和生长过程中可能是一种主要促进因子。

RNA 干扰(RNA interference, RNA i)是最近几年发展起来的一门新兴的抑制基因表达技术,是双链 RNA(dsRNA)介导的在基因的转录后水平上特异性抑制具有与 dsRNA 同源序列的基因的表达式的过程,属序列特异性的转录后基因沉默<sup>[3]</sup>。腺病毒载体因具有感染细胞种类多、感染效率高、外源基因表达水平高且既适于体外又适于体内研究等特点而被广泛用于基因治疗和临床试验中<sup>[4]</sup>,所以本研究采用了腺病毒介导的 RNA 技术来验证干扰 VEGF 是否可以干扰血管形成。结果证明,AdH1-sRNA/VEGF 确实可以干扰血管形成。

## 1 材料

穿梭载体 pShuttle-H1 质粒由德国学者 Shen CX 和 Reske SN 惠赠,腺病毒骨架 pAdEasy-1 质粒由美国学者 He TC 和 Vogelstein B 惠赠。大肠杆菌 BJ5183、DH5 $\alpha$  由本实验室保存。人胚胎肾(human embryonic kidney HEK)293A 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells HUVEC)细胞购自北京清源昊公司。所有的限制性内切酶、连接酶均为 New England Biolabs 产品。小量质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司。Trizol RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 产品,MLLV 反转录酶和 Taq 酶均为 Promega 公司产品。Real-time PCR 的试剂盒为 TaKaRa 公司的 SYBR<sup>R</sup> Rer mix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒。空载重组腺病毒 AdCMV/GFP 为本实验室保存。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

293A 细胞用于包装和扩增腺病毒,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, HUVEC 用专用的内皮细胞培养基(EGM)在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 湿度饱和的条件下进行常规培养。

### 2.2 重组腺病毒的构建

人 VEGF 的 cDNA 序列来自于 GenBank(登录号: NM\_003376),用 Ambion 公司网页上提供的在线工具(the sRNA Target Finder)找出潜在的靶序列,再按 sRNA 设计的一般原则选取靶序列。本实验选取的靶序列是: VEGF: 5'-GAGGTGAAGTTCATGGATG-3' (sense)。目的片段按照 Shen 等的方法插入穿梭载体 pShuttle-H1 中,接着与腺病毒骨架 pAdEasy 在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组。腺病毒的包装、扩大和滴度测定均按照 He 等的简化体系进行。具体条件参照文献[5]。

### 2.3 腺病毒感染 HUVEC 细胞

用少量的含有一定比例的腺病毒的无血清内皮细胞培养基在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 湿度饱和的培养箱中培养 2 h,待腺病毒被吸收后换新鲜的培养基继续培养,含 GFP 的重组腺病毒(AdCMV/GFP)作为对照计算感染效率。感染效率经测算定为 150。

### 2.4 RT-PCR 和实时定量 PCR (Real-time PCR)

HUVEC 细胞接种于  $\phi$ 60 mm 培养皿,按照上述方法感染相应病毒 24 h 后收集细胞用 Trizol(Invitrogen)提取总 RNA, Bio-Rad 法测定 RNA 量。取 5  $\mu$ g 的总 RNA 反转录合成单链 cDNA,取 1  $\mu$ L 反转录产物进行常规 PCR 扩增, GAPDH 为内参。Real-time PCR 按照 TaKaRa 公司的 SYBR<sup>R</sup> Rer mix Ex Taq<sup>TM</sup> 产品试剂盒

说明书操作. VEGF 的扩增引物为: 5'-TCCTCACACCATTGAAACCA-3' (正义), 5'-CACCGATCAGG-GAGAGAGAG-3' (反义); FLT-1 的扩增引物为: 5'-TTTGATGAGCAGTGTGAGG-3' (正义), 5'-GTGCTG-CATCCTTGTGAGA-3' (反义); KDR 的扩增引物为: 5'-TGATCGGAAATGACACTGGA-3' (正义), 5'-TGCT-TCACAGAAGACCATGC-3' (反义); GAPDH 的扩增引物为: 5'-AACGGATTTGGTCGTATT-3' (正义), 5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3' (反义).

### 2.5 细胞增殖实验

将 HUVEC 调整到  $3 \times 10^5$  cells/mL, 加入事先以 4% 明胶包被的 24 孔板, 每孔 500  $\mu$ L 常规培养 24h 后, 按照 2.3 中的方法分别感染 AdH1/null 和 AdH1-sRNA/VEGF, 每隔 48h 换液. 分别在第 3 5 7 9 d 对一块 24 孔板各孔消化, 血球计数板倒置显微镜下计数.

### 2.6 体外血管形成实验

按照文献 [6] 叙述的方法, 略加修改. 简要过程如下: Matrigel 于 4℃ 过夜融化, 加入预冷的 96 孔板, 37℃ 培养箱中平衡 1 h 预先感染了腺病毒的 HUVEC 细胞和对照细胞经胰酶消化调整细胞浓度为  $3 \times 10^5$  cells/mL, 每孔加入 100  $\mu$ L 的细胞悬液到预先铺好并凝结的 Matrigel 上, 37℃ 培养箱中常规培养, 于倒置相差显微镜下观察、拍照, 同时每孔随机计数 4 个视野 (100 $\times$ ) 的小管数目, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次.

### 2.7 统计学分析

所有实验数据用 SPSS 8.0 软件进行了多样性分析 (ANOVA),  $p < 0.05$  的数据认为具有统计学意义.

## 3 实验结果

### 3.1 干扰病毒可以特异性下调 VEGF 的 mRNA 水平

荧光实时定量 PCR 检测 HUVEC 细胞中 VEGF 和 GAPDH mRNA 表达情况. 如图 1 所示, 与干扰病毒空载对照相比, AdH1-sRNA/VEGF 病毒能有效地下调目的基因的 mRNA 水平, 下调量与空载相比下降了 50%, 而作为内参的 GAPDH 表达没有影响.

### 3.2 AdH1-sRNA/VEGF 对 HUVEC 细胞增殖的影响

VEGF 具有促进内皮细胞分裂、增殖, 诱导血管新生的作用. 为了验证干扰腺病毒对 HUVEC 细胞生长、增殖等生命活动的影响, 对感染干扰病毒后 HUVEC 的增殖情况进行了观察. 实验结果显示空白对照, 细胞的增殖情况最好, 空载病毒对 HUVEC 细胞增殖影响不大, AdH1-sRNA/VEGF 对 HUVEC 细胞增殖的影响最显著, 细胞增殖速度明显下降, 如图 2 所示.

### 3.3 AdH1-sRNA/VEGF 在体外对 HUVEC 细胞形成血管的影响

HUVEC 在适宜的基质 Matrigel 上可以形成类微血管状结构. 实验结果进一步证实腺病毒 AdH1-sRNA/VEGF 可以影响 HUVEC 在体外形成微血管的能力, 与对照组相比实验组 (感染了 AdH1-sRNA/VEGF) 的 HUVEC 在 Matrigel 上形成的类微血管数目明显减少, 如图 3 所示, 空载病毒和空白对照孔的微血管形成数量相差不大, 为 10~12 条/HPF, 而 AdH1-sRNA/VEGF 孔平均有 6~8 条/HPF, 且类微血管形状也有明显差别. 如图 4 所示, 空白对照孔的微血管形成数量多, 且交叉处无细胞堆积, 空载病毒和空白对照孔的微血管形成数量相差不大, 但血管交叉处有少部分细胞堆积, AdH1-sRNA/VEGF 勉强可以形成微血管, 病毒干扰使形成的类微血管形状不清晰, 有大量细胞在交叉处变形堆积.

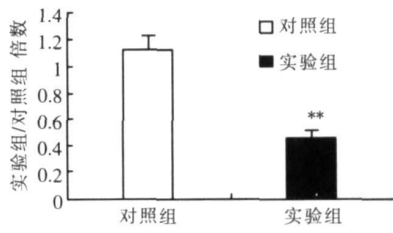


图 1 VEGF 干扰效果对比

Fig.1 Comparison of effect VEGF interfering

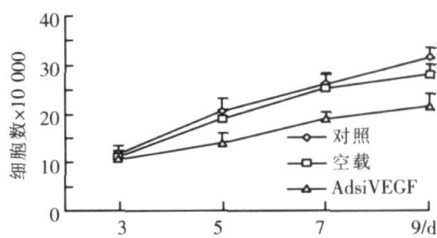


图 2 HUVEC 细胞的增殖情况影响 ( $p < 0.01$ )

Fig.2 Effect of the proliferation HUVEC cell ( $p < 0.01$ )

## 4 结论

由以上实验可知,用所构建的 AdH1-sRNA /VEGF 干扰病毒对 HUVEC 细胞在细胞增殖以及在 Matrigel 上形成微血管的数量和形成微血管的形态均有干扰作用,干扰后 HUVEC 细胞的增殖速度明显下降;无论从微血管形成数量还是血管形成的形态改变来看,AdH1-sRNA /VEGF 都对 HUVEC 细胞形成血管有明显的抑制作用.相比之下,血管形成的形态改变更

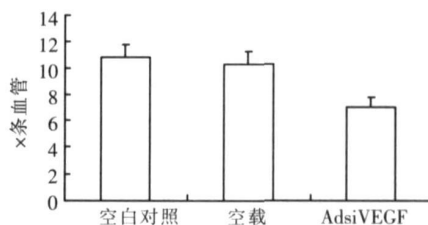
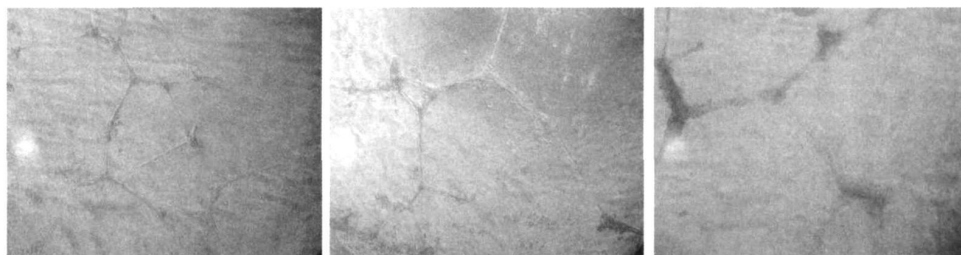


图 3 病毒影响血管形成数量

Fig.3 Adenovirus interfere tube formation number



空白对照

空载

AdsiVEGF

图 4 病毒影响血管形状改变

Fig.4 Adenovirus interfere tube shape change

为明显.

## 5 讨论

VEGF 作为刺激血管生成的主要因子,在肿瘤血管生成的过程中发挥着重要作用.在实体瘤中,由于缺氧的刺激,导致肿瘤细胞 VEGF 表达量明显增加,刺激肿瘤血管生成.到目前为止,大多数研究抗肿瘤血管治疗的重点是放在对 VEGF 及其受体表达的抑制上.研究者在临床前动物模型中先后发展了采用抑制性的 VEGF 抗体或 VEGF 受体的抗体 (或者用 VEGF 受体的类似物来竞争性结合 VEGF),试图通过阻断 VEGF 与其受体应答来抑制血管新生和肿瘤生长,并作为一种潜在的抗血管治疗方案进行了许多研究.但是,由于种种原因,这些方法没有多大进展.因此,以 VEGF 及其受体为靶点的抗肿瘤血管生成的基因治疗方法逐渐受到重视.主要有以下几种:反义基因治疗;RNA 干扰;导入抑癌基因;内皮细胞信号干扰;阻断 VEGF 位点等等.其中, RNA 干扰是较有前景的一种方法. Zhang 等<sup>[7]</sup>在最近的研究中,将针对鼠 VEGF 的 RNA 干扰序列插入到 RNA 聚合酶 III 启动子的下游并转染至小鼠体内,成功地封闭小鼠体内 VEGF 基因的表达,并认为 RNA i 能有效地抑制肿瘤血管生成. Reich 等<sup>[8]</sup>建立了由于缺氧和激光凝固术后造成的视网膜新生血管化小鼠模型,并以腺病毒为载体将靶向人 VEGF mRNA 的 sRNA 注射至小鼠视网膜细胞,成功地抑制了 VEGF 的表达,减少了视网膜新生血管化.因此,用 RNA i 的方法抑制肿瘤血管生成成为一种重要的选择.

在 RNA 干扰技术的发展过程中,以腺病毒为载体导入的方法具有操作更简便、转导效率更高的特点,不仅可用于体外实验,更为重要的是可直接用于动物实验.因此,本实验构建针对 VEGF 的 sRNA 表达重组腺病毒 AdH1-sRNA /VEGF,感染 HUVEC 细胞.该实验中,AdH1-sRNA /VEGF 病毒能有效地下调目的基因的 mRNA 水平,下调量与空载相比下降了 50%,而作为内参的 GAPDH 表达没有影响.在 RNA 干扰技术的应用研究上,干扰序列的选择是非常关键的,干扰序列的选择不同直接影响干扰效率,本实验中的干扰序列由 sRNA 设计软件随机设计而成,因此,50% 的干扰效率是比较正常的.观察该病毒对 HUVEC 细胞体外增殖和形成微血管的干扰作用,从实验结果可知,AdH1-sRNA /VEGF 对 HUVEC 细胞在 Matrigel 上形成微血管无论是微血管形成数量还是血管形成的形态改变均有干扰作用.因此,我们认为针对 VEGF 的 sRNA 表达重组腺病毒 AdH1-sRNA /VEGF 确实可以干扰 HUVEC 细胞自身分泌的 VEGF 因子,并对 HUVEC 细胞体外增殖和形成微血管有较强的干扰作用.因此,腺病毒介导的 RNA 干扰技术降低 VEGF 转录以抑制血管形成的研究可以为肿瘤的基因治疗提供较好的思路.

(下转第 92 页)

以上只是建立了当需求和生产成本同时发生扰动时的动态模型, 可以根据模型利用数量折扣策略来协调这些情况下的供应链.

[参考文献] (References)

[ 1 ] Clausen J, Hansen J, Larson J, et al. Disruption management[ J]. OR MS Today, 2001, 28(5): 40– 43

[ 2 ] Debra Ekins, Robert Handfield, Jennifer Blackhurst. Ways to guard against disruption [ J]. Supply Chain Management Review, 2005( 11/12): 46– 53

[ 3 ] Lisa M Hauser. Risk-adjusted supply chain management [ J]. Supply Chain Management Review, 2003( 11/12): 64– 71.

[ 4 ] Uta Juttner, Helen Peck, Martin Christopher. Supply chain risk management: Outlining and agenda for future research [ J]. International Journal of Logistics Research and Applications, 2003( 6): 197– 210

[ 5 ] Paul R Kleindorfer, Germaine H Sad. Managing disruption risks in supply chains [ J]. Production and Operations Management, 2005, 14( 1): 53– 68

[ 6 ] Xu M, Qi X, Yu G, et al. The demand and disruption management problem for a supply chain system with non linear demand functions [ J]. Journal of Systems Science and Systems Engineering, 2003, 12( 1): 82– 97.

[ 7 ] Xu M, Gao X. Supply chain coordination with demand and disruptions under convex production cost function [ J]. Journal of Wuhan University: Natural Science Edition, 2005, 10( 3): 493– 498

[责任编辑: 刘 健]

(上接第 87 页)

[参考文献] (References)

[ 1 ] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[ J]. Nat Med, 1995, 1( 1): 27– 31

[ 2 ] Ferrara N, Henzel W J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells[ J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161( 2): 851– 858

[ 3 ] Hannon G J. RNA interference[ J]. Nature, 2002, 418( 6894): 244– 251

[ 4 ] Shen C, Buck A K, Liu X, et al. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA[ J]. FEBS Lett, 2003, 539: 111– 114

[ 5 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning[ M ]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[ 6 ] Annabi B, Thibeault S, Lee Y T, et al. Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells[ J]. Exp Hematol, 2003, 31: 640– 649.

[ 7 ] Zhang L, Yang N, Moham ed-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: 1169– 1178

[ 8 ] Reich S J, Fosnot J, Kuok i A, et al. Small interfering RNA ( siRNA ) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model[ J]. Mol Vis, 2003, 9: 210– 216.

[责任编辑: 严海琳]