

siRNA 干扰胃癌细胞内源性 VEGF-C 的基因和蛋白表达的实验研究

郭梅梅¹, 王 永², 韩方海^{3△}

1. 广东医学院附属南山医院 消化内科(深圳 518000); 2. 广东医学院附属南山医院 胃肠外科(深圳 518000);
3. 中山大学附属第一医院 胃肠胰外科(广州 440100)

【摘要】 目的 探索 siRNA 干扰技术阻断胃癌细胞内源性血管内皮生长因子-C(VEGF-C)的基因和蛋白表达的有效性。**方法** 培养胃癌细胞株 SGC7901, 选择 GenBank 的 Accession No. BC035212.1 设计 5 条 VEGF-C 基因特异的 siRNA 引物, 并进行同源性检索及合成。分别观察不同 siRNA 引物转染胃癌细胞株 SGC7901 后对其内源性 VEGF-C mRNA 和蛋白表达的影响。**结果** 本实验成功将 VEGF-C-siRNA 导入胃癌细胞, 5 条 siRNA 都能抑制 VEGF-C mRNA 及蛋白的表达, 但 siRNA 引物 3、4 阻断表达的效果最佳。**结论** siRNA 技术可以有效地阻断胃癌细胞中内源性 VEGF-C 的基因及蛋白表达。

【关键词】 胃癌 淋巴管新生因子 siRNA 体外实验

The Study of Interfering of Endogenous VEGF-C Genes and the Protein Expression Gastric Cancer Cell with siRNA Technique GUO Mei-mei¹, WANG Yong², HAN Fang-hai^{3△}. 1. Department of Gastroenterology, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518000, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518000, China; 3. Department of Gastrointestinal and Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 440100, China

△ Corresponding author, E-mail: fh_han@163.com

【Abstract】 Objective To explore the interfering effects of siRNA on endogenous VEGF-C genes and the protein expression in gastric cancer cells. **Methods** Cultured gastric cancer cell line SGC7901 cells were prepared *in vitro*. Five siRNA primers of VEGF-C were designed depending on the sequence of Accession No. BC035212.1 in Genbank. After homology analysis, the primers were synthesized and transfected into SGC7901 cells. The endogenous VEGF-C mRNA level and its protein expression were observed. **Results** VEGF-C-siRNA was inserted into the gastric cancer cell successfully. Five siRNA primers of VEGF-C could inhibit VEGF-C genes and protein expression. **Conclusion** siRNA could block the endogenous VEGF-C genes and the protein expression in gastric cancer cell.

【Key words】 Gastric cancer Lymph vessel growth factor siRNA *In vitro*

胃癌是危害人类健康常见的恶性肿瘤,其死亡率仍位列消化道肿瘤前茅。腹膜种植和淋巴结转移是影响胃癌预后的两个主要因素。淋巴转移是主要的转移途径^[1]。自 20 世纪 70 年代 Folkman 首先提出肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤组织内新生的血管以来,肿瘤研究者对于血管形成与肿瘤的增殖、侵袭转移的关系极为重视。血管内皮生长因子-C(VEGF-C)是一个高分子糖蛋白,是细胞表面酪氨酸,相对分子质量大约 180×10^3 , VEGF-C 广泛表达于血管内皮细胞。1996 年 Joukov 等^[2]发现 VEGF-C 的蛋白和 cDNA 在人的前列腺癌细胞株的细胞质中有表达,并发现 VEGF-C 可以刺激内皮

细胞的转移和增生。VEGF-C 还是淋巴刺激因子,可以导致淋巴腺增生^[3],并证实其在促进肿瘤转移上也起到一定作用^[2,4]。同时,体内外实验还发现 VEGF-C 可以刺激肿瘤血管内皮细胞增殖^[5-7]。

鉴于 VEGF-C 在肿瘤中的作用,本实验旨在利用小干扰 RNA(siRNA)抑制 VEGF-C 的表达,为进一步的肿瘤血管干预治疗提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

胃癌细胞株 SGC7901 购自中科院上海细胞生物研究所,小牛血清、胰酶购自美国 Hyclone 公司;细胞培养瓶及培养板、RMPI 1640 购自美国 Invitrogen 公司;QRT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen

△ 通讯作者, E-mail: fh_han@163.com

公司; Western blot Kit 购自 Cell Signaling Technology 公司; 鼠抗人 VEGF-C 多克隆抗体、鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠二抗购自 Santa Cruz 公司; 脂质体 Lipo fectamine 2000™ 和 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养

SGC7901 细胞株培养于含有 10% 小牛血清及青、链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 ℃、5%

CO₂ 的恒温箱中进行培养。倒置显微镜下观察细胞的生长。

1.3 siRNA 引物的设计与合成

VEGF-C 基因特异的 VEGF-C-siRNA: 以 GenBank (No. BC035212. 1) 中所报道的 VEGF-C 基因序列为 siRNA 设计的模板。VEGF-C 基因的碱基编号以 GenBank No. BC035212. 1 为准。通过化学方法合成以下 siRNA 序列 (由 Invitrogen 公司合成), 末端以绿色荧光蛋白标记。见表 1。

表 1 合成的 siRNA 序列
Table 1 The siRNA sequence

No. of siRNA	Sense	Antisense	Position (bp)
VEGF-C1	5'-GAAGUUCCACCACCAAACAdTdT-3'	5'-UGUUUGGUGGUGGAACUUCdTdT-3'	853-872
VEGF-C2	5'-CCAUGUGUGUCCGUCUACAdTdT-3'	5'-UGUAGACGGACACACAUGGdTdT-3'	195-214
VEGF-C3	5'-CCAUGCUAACAAAGACAAAdTdT-3'	5'-UUUGUCUUUGUUAGCAUGGdTdT-3'	1 084-1 103
VEGF-C4	5'-CUGUGAAUGUACAGAAAGUdTdT-3'	5'-ACUUUCUGUACAUUCACAGdTdT-3'	808-827
VEGF-C5	5'-UUACAGUGCCUCUCUCUAdTdT-3'	5'-UGAGAGAGAGGCACUGUAAdTdT-3'	294-313
Negative control	5'-UAGACAUACAACACACAGAdTdT-3'	5'-UCUGUGUGUUGUAUGUCUAdTdT-3'	

1.4 Lipofectamin2000 介导 siRNA 转染 SGC7901 细胞

在 24 孔板上接种细胞, 次日细胞密度达到 70%~80%。将 0.2 μg VEGF-C-siRNA 用 opti-MEM 稀释至 50 μL, 使用前轻轻混匀 lipofectamine 2000, 取 2 μL 用 opti-MEM 稀释至 50 μL, 在室温下放置 5 min; 将 siRNA 稀释液和 lipofectamine 2000 稀释液混匀, 在室温下放置 30 min, 加入培养基中, 振板摇匀。24~72 h 后荧光显微镜下观察转染效果, 随机挑选 10 个视野, 计算观察到的荧光细胞数/观察的细胞总数×100% 作为转染效率。

1.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测 VEGF-C mRNA 的表达

实验分为胃癌 SGC7901 细胞组、阴性对照组、5 对不同 VEGF-C-siRNA 的转染组, 细胞转染 24 h 后收集各组细胞, 按照 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 说明书提取总 RNA。VEGF-C 上游引物序列 5'-ATCAAGCGCTTCGAGCAGAA-3', VEGF-C 下游引物序列 5'-TGGTCGGTCTTTTCAGGTCAAT-3'; GAPDH 上游引物序列 5'-ACACCTTC TACAATGAGC-3', GAPDH 下游引物序列 5'-CGTCACACTTCATGATG-3' (引物序列由 Invitrogen 公司合成)。RT 反应条件: 30 ℃ 10 min, 42 ℃ 30 min, 99 ℃ 5min, 5 ℃ 5 min, 所得反应混合液用于下一步的 PCR 反应。PCR 反应条件: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 40 个循环。实验中使用试剂盒为 Real Time RT-

PCR core kit (实验步骤严格按试剂盒说明操作), 使用仪器为 7000 Sequence Detection system (美国 ABI 公司), Smart Cycler II 实时定量 PCR 仪自动绘制标准曲线及熔解曲线。结果使用 Comparative Delta-delta Ct 法进行分析, 即将所测得样品的 Ct 平均值代入标准曲线, 得出内参基因和目的基因的表达量。

1.6 Western blot 检测 VEGF-C 蛋白的表达

实验分组同 1.5。细胞转染 24 h 后, 分别收集各组细胞于 EP 管中, 提取细胞总蛋白, Bradford 比色法测定蛋白质含量。操作按照试剂盒说明进行操作, 一抗为鼠抗人 VEGF-C 多克隆抗体, 抗体浓度为 1 : 500, 以 GAPDH 为内参, 抗体浓度为 1 : 1 000。采用 Fluor Chem™ 8900 凝胶成像及化学发光系统 (Alpha Innotech 公司, 美国) 进行图像分析, bandscan5.0 软件测定蛋白条带的灰度, 并用目的蛋白条带灰度/内参蛋白条带灰度的比值作为该蛋白的相对含量。

1.7 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, α=0.05。

2 结果

2.1 胃癌细胞 SGC7901 转染体系的建立

胃癌细胞 SGC7901 转染体系建立成功, 在绿色荧光激发波长下细胞显示为绿色, 形态正常。转染后 24 h 后荧光显微镜下观察, 转染成功, 经细胞计

数计算转染效率为 72%。见图 1。

2.2 标准曲线的制作

标准曲线以阴性对照组质粒 DNA 拷贝数的对数为横坐标,以荧光信号达到设定阈值时所经过的循环数值(threshold cycle,Ct)为纵坐标,绘制标准曲线,其线性相关性 $R^2=0.998\ 5$ 。

2.3 不同 siRNA 对 VEGF-C mRNA 表达的影响

经分析后得出,不同 siRNA 对 VEGF-C 的干扰结果不同;其中 VEGF-C5 干扰后的 VEGF-C mRNA 表达量为 18×10^4 拷贝数/ μg mRNA;

VEGF-C4 干扰后的 VEGF-C mRNA 表达量为 7.37×10^4 拷贝数/ μg mRNA; VEGF-C3 干扰后的 VEGF-C mRNA 表达量为 5.45×10^4 拷贝数/ μg mRNA; VEGF-C2 干扰后的 VEGF-C mRNA 表达量为 10×10^4 拷贝数/ μg mRNA; VEGF-C1 干扰后的 VEGF-C mRNA 表达量为: 12.4×10^4 拷贝数/ μg mRNA。经统计分析,5 组间差异无统计学意义($P>0.05$),5 对 VEGF-C-siRNA 均能抑制 VEGF-C mRNA 的表达。见图 2。

2.4 不同 siRNA 对 VEGF-C 蛋白表达的影响

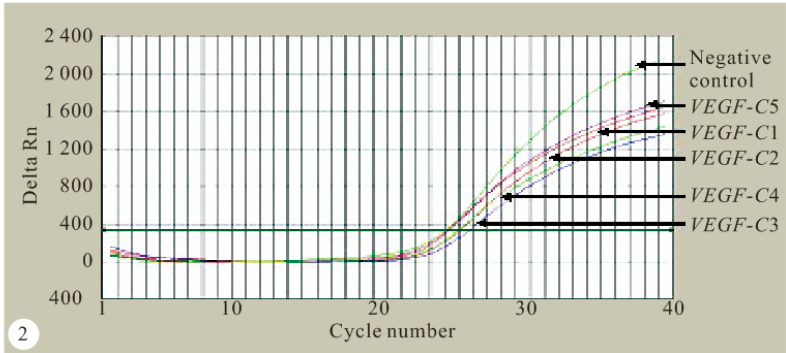
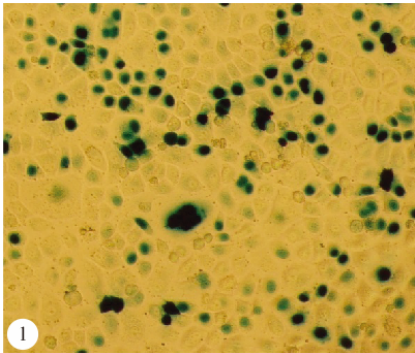


图 1 转染后细胞荧光显微镜照片。×200

图 2 VEGF-C1、VEGF-C2、VEGF-C3、VEGF-C4、VEGF-C5 对 VEGF-C mRNA 的抑制结果

Fig 1 Cell fluorescent micrograph after transfection. ×200

Fig 2 The inhibition effect of siRNA by VEGF-C1、VEGF-C2、VEGF-C3、VEGF-C4 and VEGF-C5

Western blot 结果(图 3)显示,7 组细胞都见有内参照 GAPDH 条带与 VEGF-C 条带,但胃癌 SGC7901 细胞组与阴性对照组较其他 VEGF-C-siRNA 组表达明显增强。经成像系统分析,胃癌 SGC7901 细胞组与阴性对照组的灰度值分别为 1.087 ± 0.073 、 1.171 ± 0.086 ,VEGF-C1~VEGF-C5 组的灰度值分别为 0.886 ± 0.063 、 0.843 ± 0.088 、 0.801 ± 0.056 、 0.791 ± 0.075 、 0.854 ± 0.068 ,干扰组与阴性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。不同干扰组间的比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

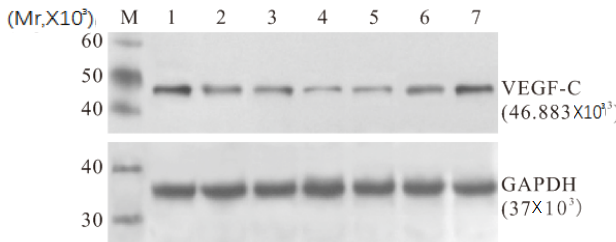


图 3 Western blot 检测 VEGF-C 蛋白表达的变化

Fig 3 Expression levels of VEGF-C protein detected by Western blot

M: Marker; 1: SGC7901 cell line; 2: VEGF-C1; 3: VEGF-C2; 4: VEGF-C3; 5: VEGF-C4; 6: VEGF-C5; 7: Negative control

3 讨论

胃癌是世界上导致患者死亡的常见疾病之一,在肿瘤死亡的原因中,男性居第三位,女性居第五位^[8];目前手术切除、放化疗仍是胃癌的最主要的治疗手段。任何肿瘤组织的生长都离不开血管血液的供给,肿瘤体积增殖到 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 时要形成新生血管以提供营养和氧气等,肿瘤细胞分泌可扩散的血管生成因子,完成血管从无到有的阶段性转变,即“血管源性转换”^[9-11],这对肿瘤细胞的生长和侵入必不可少。1989 年 Ferrara 等^[12]从正常垂体滤泡星状细胞中分离出一种能特异地作用于血管内皮细胞,促进血管内皮细胞分裂、增殖的蛋白质,称为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),已确定有 VEGF-A、B、C、D、E 和胎盘生长因子(placenta growth factor, PIGF),其中 VEGF-C 最重要。人类 VEGF-C 位于第 6 号染色体的第 8 外显子和第 7 内含子上,编码几个不同的异构体,与 VEGFR-2 结合,作用于血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)信号系统,促进 ECs 增殖、分化、移动、生长以及存活,促进单核细胞趋化,增加血管渗透性等^[13-16]。肿瘤细胞通过对 VEGF 系统

的调节,从内皮干细胞或者血管内皮细胞形成新的肿瘤特异性毛细血管系统。依赖新生的血管,肿瘤细胞不仅可以存活,还可以进入血流,发生转移播散和在远隔部位形成新的转移灶^[17,18]。由此可推测,VEGF-C 的表达可以促进肿瘤细胞的生长、转移,如果将 VEGF-C 基因敲除则对肿瘤细胞的生长及转移不利。本实验利用脂质体成功将 5 对 VEGF-C-siRNA 导入胃癌 SGC7901 细胞,通过 QRT-PCR 及 Western bolt 检测 VEGF-C 的 mRNA 及蛋白水平发现,经过 siRNA 处理的细胞组,其 VEGF-C 的 mRNA 及蛋白表达量较阴性对照组相比明显下降,这为胃癌将来靶向治疗提供了一定的实验基础。但 VEGF-C-siRNA 对肿瘤细胞的抑制效果及其可能的机制还有待进一步的实验证明。

参 考 文 献

1 Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, *et al.* Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem*,2003;278(42):40973-40979.

2 Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, *et al.* A novel vascular endothelial growth factor VEGF-C is a ligand for the flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*,1996;15(5):290-295.

3 Breslin JW, Yuan SY, Wu MH. VEGF-C alters barrier function of cultured lymphatic endothelial cells through a VEGFR-3-dependent mechanism. *Lymphat Res Biol*,2007; 5 (2):105-113.

4 Karpanen M, Egeblad M, Karkkainen MJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor C promotes tumour lymphangiogenesis and intralymphatic tumour growth. *Cancer Res*.2001;61(11):1786-1790.

5 Witzensbichler B, Asahara T, Murohara T, *et al.* Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol*, 1998;153(2):381-394.

6 Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, *et al.* Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol*,2003;162(2):575-586.

7 Duff SE, Li C, Renehan AO, *et al.* Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C. *Int J Oncol*,2003;22(2):339-343.

8 Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, *et al.* Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res*.2002;62(5):1315-1320.

9 Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in preoperative biopsy specimens and metastatic foci of regional lymph nodes in submucosal gastric carcinoma. *World J Surg Oncol*,2005; 3 (1):1172-1179.

10 Tanaka K, Nishioka J, Kato K, *et al.* Mitotic checkpoint protein hsMAD2 as a marker predicting liver metastasis of human gastric cancers. *Jpn J Cancer Res*,2001; 92 (9): 952-958.

11 Bikfalvi A, Moenner M, Javerzat S, *et al.* Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochem Soc Trans*,2011;39(6):89-93.

12 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*,1989;161(2):851-858.

13 Helfrich I, Scheffrahn I, Bartling S, *et al.* Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med*,2010;207(3):491-503.

14 Wagner AD, Arnold D, Grothey AA, *et al.* Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res*,2009; 87(9):95-99.

15 Saranadasa M, Wang ES. Vascular endothelial growth factor inhibition: conflicting roles in tumor growth. *Cytokine*,2011; 53(2):115-129.

16 Keunen O, Johansson M, Oudin A, *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*,2011;108 (5):3749-3754.

17 Torben FH, Anders J. Clinical implications of genetic variations in the VEGF system in relation to colorectal cancer. *Pharmacogenomics*,2011;12(12):1681-1693.

18 Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 2005;15(3):102-111.

(2013 - 02 - 27 收稿,2013 - 05 - 24 修回)

编辑 余 琳