

siRNA 对 VEGFR₂ 的表达抑制及对 HL60 细胞和 人内皮细胞的影响

郭海霞¹, 薛红漫¹, 夏焱¹, 徐令², 徐宏贵¹, 李文益¹

(中山大学附属第二医院 1.儿科, 2.医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】为探索治疗白血病的新思路研究了小干扰 RNA(siRNA)对肿瘤细胞株 HL60 和血管内皮细胞(EC)株 EA·hy926 血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR₂)基因表达的抑制作用。【方法】制备并筛选 VEGFR₂ 基因的最有效 siRNA,并据此设计 shRNA 寡核苷酸链,构建 pENTR™/U6 干扰表达载体。瞬时转染细胞,采用 MTT 法、RT-PCR 法及 Western blot 测定 VEGFR₂ 表达抑制情况。【结果】VEGFR₂ siRNA a、b、c 抑制 HL60 细胞效率分别为 77.5%、45.0%、80.9%,以 siRNA c 最高,利用其 shRNA 和 pENTR™/U6 构建的入门克隆转染 HL60,抑制细胞效率达 99.1%;此入门克隆对 VEGFR₂ 基因 mRNA 和蛋白的表达抑制在 HL60 和 EA·hy926 细胞均显著。【结论】在体外 shRNA 表达载体可有效抑制 HL60 细胞 VEGFR₂ 自分泌和旁分泌,有效抑制白血病细胞生长。

关键词: siRNA; VEGFR₂; HL60 细胞; EC

中图分类号: R361

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0276-05

Influence of VEGFR₂ Expression and Effects on HL60 Cell and Human Endothelial Cell Using siRNA

GUO Hai-xia¹, XUE Hong-man¹, XIA Yan¹, XU Ling², XU Hong-gui¹, LI Wen-yi¹

(1.Department of Pediatrics, 2. Center of Medical Research, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To explore a new way to treat leukemia, the inhibitory effect of small interfering RNA (siRNA) on VEGFR₂ gene expression of tumor cell line HL60 and human endothelial cell (EC) line EA·hy926 was studied.【Methods】siRNAs for VEGFR₂ gene were designed and the most efficient was chosen after being transfected into HL60 cells. pENTR™/U6 interfering expression system was constructed. HL60 and EA·hy926 cells were transfected. VEGFR₂ expression was tested with MTT assay, RT-PCR, and Western blot analysis.【Results】The inhibitory rates of VEGFR₂ siRNA a, b, c were 77.5%、45.0%、80.9% respectively, among which of siRNA c being the highest. VEGFR₂ expression in HL60 and EA·hy926 was both inhibited by using shRNA and pENTR™/U6 entry clone. For HL60 cell, the inhibitory rate was 99.1%.【Conclusion】shRNA interfering expression system can inhibit VEGFR₂ self-secretion and para-secretion of HL60 cell in vitro, which inhibits leukemia growth.

Key words: siRNA; VEGFR₂; HL60; human endothelial cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):267-280]

近年来的研究成果证实了肿瘤生长依赖于血管生成,并发现血管生成也是肿瘤转移所必需的,且至少部分导致肿瘤多药耐药。肿瘤细胞分泌的多种血管生成因子之间相互联系和调控,其中血

管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)处于整个肿瘤血管生成过程的上游和中心,而且 VEGF

收稿日期: 2006-01-25

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(5100992)

作者简介: 郭海霞(1971-),女,山东东营人,博士生,主治医师;李文益,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: liwenyisums@hotmail.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

与白血病的关系日益受到重视^[1-4]。本研究利用先进的 shRNA RNAi 技术, 沉默人血管内皮细胞和表达 VEGFR₂ 的白血病细胞株 HL60 细胞中 VEGFR₂ 的表达, 观察对人 EC 和 HL60 生长的影响。

1 材料与方法

1.1 设计 VEGFR₂ siRNA

根据 GenBank 人 VEGFR₂ 基因已知序列 (基因编号 AF035121) 按 siRNA 序列设计的原则将潜在的序列在 GenBank 用 Blast Research 软件进行同源序列搜索, 排除那些和其他编码序列或 EST 同源的序列。选取 3 个 21 bp 的 siRNA (siRNA a, siRNA b, siRNA c), 另设随机序列作为阴性对照 siRNA control。siRNA 序列如下: siRNA a 靶序列: 5 - ATGCCACCATGTTCTCTAATA - 3, 正义链: 5 - GCC ACC AUG UUC UCU AAU ATT - 3, 反义链: 5 - UAU UAG AGA ACA UGG UGG CAT - 3; siRNA b 靶序列: 5 - CTCCACAGATCATGTGG TTTA - 3, 正义链: 5 - CCA CAG AUC AUG UGG UUU ATT - 3 反义链: 5 - UAA ACC ACA UGA UCU GUG GAG - 3; siRNA c 靶序列: 5 - ACGCTGACATGTACGGTCTAT - 3, 正义链: 5 - GCU GAC AUG UAC GGU CUA UTT - 3, 反义链: 5 - AUA GAC CGU ACA UGU CAG CGT - 3; siRNA negative: 5 - AATTC TCC GAA CGT GTC ACG T 3'; 正义链: 5 - UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT - 3'; 反义链: 5 - ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT - 3。由上海吉玛公司合成。

1.2 细胞培养及转染筛选 siRNA

内皮细胞株 EA·hy926 由广东省人民医院心血管研究所单志新博士惠赠。用高糖 DMEM (GIBCO Corp.), 100 U/mL 氨卞青霉素, 100 μg/mL 链霉素, 嗜碱细胞生长因子 4 ng/mL, VEGF 10 μg/mL (R&D systems, oxford, UK), 150 g/L 胎牛血清, 0.1 mol/L HCl 调 pH6.8~7.0, 抽滤除菌。HL60 细胞购自上海科学院细胞所。实验前无药培养 2 周。设空白对照组、脂质体 (Invitrogen) 组以及 siRNA 组。用 lipofectamine2000 转染试剂, 按试剂盒操作说明优化转染条件将对数生长期的 HL60 细胞 (1 × 10⁶/mL) 置于 96 孔培养板中, 分别将 siRNA a、siRNA b、siRNA c、siRNA control 以 100 nmol/L 的终浓度加

入孔中, 37 °C 体积分数 5% CO₂ 培养 48 h, 48 h 后开始观察和检测所产生的 RNA 干扰的效果。2 孔收集细胞, 抽提 HL60 总 RNA。2 孔进行 MTT 实验: 结束前 4 h 每孔加入 MTT 10 μL (5 g/L), 培养结束时倾去培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 完全显色后用酶联免疫检测仪 (Bio-rad 550) 以 570 nm 波长测 A 值。按下列公式计算抑制率: 抑制率 = [(1 - 实验组 A / 对照组 A)] × 100%。

1.3 RT-PCR

用 Trizol Reagent 提取法提取 RNA (Gibico), 电泳, 紫外分光光度计定量。cDNA 合成及 PCR 扩增严格按 Superscript™ 逆转录试剂盒 (Invitrogen) 说明进行。VEGFR₂ 基因 PCR 引物: 正义链 5 - GAGGGCCACTCATGGTATTG - 3, 反义链 5 - TGCCAGCAGTCCAGCATGGTCTG - 3。反应条件: 94 °C 60 s, 57 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 3 min, 共进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物 709 bp。以 -actin 基因作为内对照。-actin 正义链 5 - TCATGTTTGAGACCTTCAA - 3, 反义链 5 - GTCTTTGCGGATGTCCACG, PCR 产物 513 bp。PCR 产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外照相。

1.4 构建 pENTR™/U6 干扰表达载体

1.4.1 shRNA 的获得 将最有效 siRNA 序列按照 Block-iT Lentiviral RNAi Expression System (Invitrogen) 中要求合成 VEGFR₂ shRNA, top strand oligo: 5 - CACCGCTGACATGTACGGTCTA TCGAAATAGACCGTACATGTACAGC - 3 bottom strand oligo: 5 - AAAAGCTGACATGTACGGTCTAT TTCGATAGACCGTACA TGTCAGC - 3, 取合成的正义链与反义链 Oligo DNA, 在退火缓冲液中加热至 95 °C, 4 min 后, 室温自然冷却 10 min, 离心 5 s, 取 1 μL 稀释 10 000 倍, 再克隆入表达载体 pENTR™/U6。其余则保存于 -20 °C。鉴定双链寡核苷酸 (ds DNA)。

1.4.2 载体构建 按照产品说明书, 用 T4 DNA ligase 连接酶连接目标片段与载体, 混匀, 室温孵育 30 min, 将编码每一个 shRNA 的 dsDNA 克隆进 pENTR™/U6 入门载体。取 2 μL 前述连接液放到 One Shot TOP10 大肠杆菌中, 轻轻混匀, 冰浴放置 20 min, 42 °C 水浴锅中放置 30 s, 立即转移至冰浴, 加入 250 μL soc 培养基, 盖上盖子在空气恒温摇床 37 °C 200 r/min 振摇 1 h。铺板 (含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养皿), 过夜培养挑选阳性克隆,

扩增、纯化, 加入体积分数 10%甘油保存于- 80。同时, 制备高纯度的 pENTR™/U6 质粒作为下步转染细胞之用, 提取质粒采用 QIAGEN 公司的试剂盒。

1.5 瞬时转染 HL60 和 EA·hy926 细胞

设定空白对照组, 脂质体组, 空 pENTR™/U6 组和实验组。将 lipofectamine 2000、无血清无抗生素培养基及 shRNA + pENTR™/U6 或空 pENTR™/U6(20 μmol/L) 分别与 DNA /RNA 稀释缓冲液配成溶液。37 体积分数 5%CO₂ 培养 48 h 后开始观察和检测所产生的 RNA 干扰的效果。收集细胞, 1 000 xg 离心 5 min, 抽提 RNA, 做 RT- PCR 及 MTT 实验、Western blot 印迹分析。一抗人 VEGFR₂ McAb(PE 标记,R&D)。

1.6 统计学处理

采用配对资料 t 检验。用 SPSS 11.0 统计学软件进行处理。

2 结果

2.1 RT- PCR 及 MTT 法检测筛选最有效 siRNA

RT- PCR 结果(图 1)表明空白对照组和空转脂质体组 709 bp 处见清晰条带, siRNA a、b、c 条带均减弱, 以 siRNA c 最明显。MTT 结果(表 1)支持上述结论: siRNA a、c 与空白对照组和空转脂质体(siRNA negative)组的 A 值及 HL60 细胞杀伤率比较有显著差异(< 0.01), 以 siRNA c 最显著。

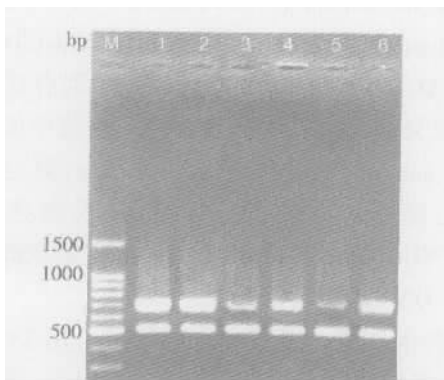


图 1 siRNA 作用后 HL60 VEGFR₂ mRNA 表达水平
Fig.1 Effect of siRNA on VEGFR₂ mRNA level in HL60 cells

M: marker; 1: Control; 2: Lipofectamine 2000; 3: siRNA a; 4: siRNA b; 5: siRNA c; 6: siNEG

2.2 构建的 pENTR™/U6 干扰体系对 HL60 VEGFR₂ 的影响

表 1 siRNA 转染 HL- 60 细胞转染各 siRNA 后的 MTT 细胞生长抑制率

Tab 1 The inhibitory effect after transfecting HL60 cell with siRNAs using MTT methods (n=3)

Group	A	Inhibitory rate(%)	t
Control	0.375 ±0.063	0	
Lipofectamine 2000	0.295 ±0.017	23.3	
siRNA a	0.108 ±0.010	77.5	7.249 < 0.01
siRNA b	0.220 ±0.026	45.0	3.939 < 0.05
siRNA c	0.097 ±0.015	80.9	7.435 < 0.01
siRNA negative	0.343 ±0.050	0	

RNase 核酸内切酶可以非常有效地结合到具有短的 3 突出的 shRNA 分子。型 pol 启动子, 例如那些来自 U6 基因的启动子, 包含了表达 RNA 的所有的重要的上游元件, 结合一个短的多聚胸苷终止区域, 构成一个 RNAi 框。构建 U6 入门载体后将 shRNA 瞬时转染入 HL60 细胞, 其抑制率高达 99.1%(表 2), VEGFR₂ mRNA 和蛋白表达条带均明显减弱(图 2, 3)。

表 2 HL- 60 细胞转染 shRNA pENTR™/U6 entry 入门克隆转染 HL60 后 MTT 细胞生长抑制率

Table 2 The inhibitory effect after transfecting HL60 cell with shRNA pENTR™/U6 entry clone using MTT methods (n=3)

Group	A	Inhibitory rate(%)
Control	0.361 ±0.028	0
Lipofectamine 2000	0.295 ±0.017	14.2
shRNA	0.077 ±0.021 ¹⁾	99.1 ¹⁾
shRNA negative	0.220 ±0.026	0

Comparing with negative group, 1) t=7.357, < 0.01

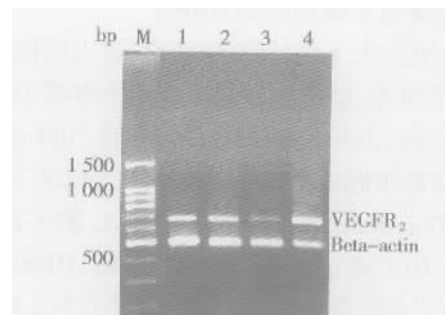


图 2 构建 pENTR™/U6 干扰体系对 HL60 VEGFR₂ mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of shRNA using pENTR™/U6 entry vector on VEGFR₂ mRNA level in HL60 cells

M:marker Lane1: control; Lane2: lipofectamine 2000; Lane 3: shRNA+pENTR™/U6; Lane 4: pENTR™/U6

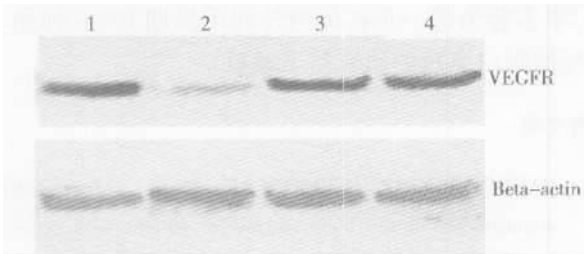


图 3 构建 pENTR™/U6 干扰体系对 HL60 VEGFR₂ 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of shRNA using pENTR™/U6 entry vector on VEGFR₂ protein level in HL60 cell (Western blot)

1: control; 2: shRNA + pENTR™/U6; 3: lipofectamine 4: pENTR™/U6

2.3 构建 pENTR™/U6 干扰体系对 EA·hy 926 VEGFR₂ 的影响

空白对照组、脂质体组、空载体组 70 bp 处可见清晰条带。同上对比 shRNA 利用 pENTR™/U6 干扰体系瞬时转染入人血管内皮细胞株 EA·hy926 后条带减弱, 表明 VEGFR₂ mRNA 和蛋白表达明显减少(图 4, 5)。

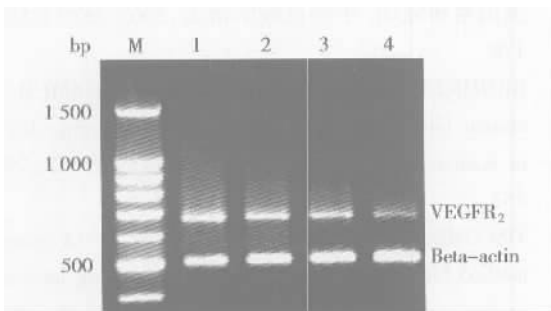


图 4 构建 pENTR™/U6 干扰体系对 EA·hy 926 VEGFR₂ mRNA 表达的影响

Fig.4 Effect of shRNA using pENTR™/U6 entry vector on VEGFR₂ mRNA level in EA·hy926 cell

M: marker; 1: control; 2: lipofectamine 2000; 3: pENTR™/U6; 4: shRNA+pENTR™/U6

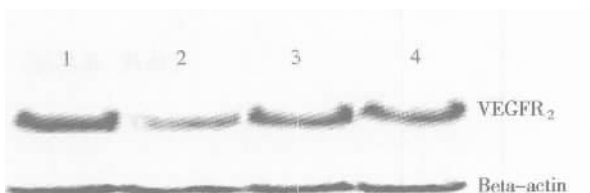


图 5 shRNA 干扰 EA·hy926 细胞 VEGFR₂ 表达的 western blot 分析结果

Fig.5 Expression of VEGFR₂ after transfection of shRNA using pENTR™/U6 in EA·hy926(Wester blot)

1: control; 2: shRNA + pENTR™/U6; 3: lipofectamine; 4: pENTR™/U6

3 讨论

血管新生在实体肿瘤的生长、播散和转移过程中起重要作用。自 1997 年起陆续有研究发现许多血液系统肿瘤均有血管新生的存在, 并且发现血管新生与儿童白血病的预后有关。最近的研究结果表明, 初诊白血病患者骨髓微血管密度明显高于正常水平, 化疗后缓解者较治疗前明显降低, 并接近对照组水平, 说明血管新生在白血病的发病机制中有重要作用^[3, 5]。

VEGFR 有 3 种: VEGFR₁ (fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1)、VEGFR₂ (kinase insert domain-containing receptor, KDR/fetal liver kinase-1, Flk-1) 和 VEGFR₃ (Flt-4)。其中 VEGFR₂ 特异地表达于血管内皮祖细胞和血管内皮细胞上, 与血管生成密切相关, 是血管内皮细胞分化、增殖的信号传导的关键受体。血管内皮细胞基因稳定不易突变, 因此针对 VEGF 及其受体的小分子药物设计具有专属性高、副作用少、不易产生耐药性的优点, 是目前抗血管生成药物研究的焦点。VEGF 不仅可由异常骨髓细胞旁分泌以促进产生新生血管, 导致骨髓异常增殖, 还可以自分泌的方式起作用。Dias 等^[3]发现部分急性白血病细胞株和约 50% 初发病人内外不仅产生 VEGF, 还表达有功能的 VEGFR₂, 其传导类似于血管内皮细胞上的受体, 可促白血病细胞增殖、导致白血病细胞产生 MMP 活性及穿越基底膜转移。本研究利用 shRNA RNAi 技术, 沉默血管内皮细胞和表达 VEGFR₂ 白血病细胞株 HL60 细胞中 VEGFR₂ 的表达。结果表明两者 VEGFR₂ mRNA 和蛋白表达明显减少, HL60 细胞生长抑制率更高达 99.1%。EC 在肿瘤血管生成中发挥重要作用, 故抑制 EC VEGFR₂ 表达可阻断其与白血病细胞分泌的 VEGF 的结合, 从而阻断了白血病细胞的旁分泌途径, 抑制新生血管形成; RNAi 作用于肿瘤细胞, 影响其 VEGF 自分泌途径, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制细胞迁移, 可达到体外抑制白血病的目的。

现已有 VEGFR₂ McAb 应用于临床实验, 但其靶点需经过细胞表面呈递来决定是否特异结合。而白血病病人免疫抑制, McAb 作用的完全性尚可疑。siRNA 干扰技术能快速、高效、特异地抑制靶基因表达, 在疾病的基因治疗上有广阔的应用前

景。siRNA 的制备方法之一为 siRNA 表达载体法^[6]: 通过转染含有 RNase 启动子 U6 或 H1 及其下游一小段特殊结构的质粒或病毒到宿主细胞体内, 转录出 shRNA, shRNA 在胞内被 RNA 核酶内切酶酶剪切成 siRNA 而发挥作用。其优点是转录筛选后可稳定表达, 允许包括胚胎干细胞在内的大范围细胞系 RNAi 的持续作用; 解决转染效率低的问题, 无 RNase 污染。缺点是不适于筛选有效 siRNA 序列。我们用化学合成法先筛选出最有效 siRNA 序列, 然后利用 Invitrogen 的 Block-iT Lentiviral RNAi Expression System 构建慢病毒入门克隆, 转染 EA·hy926 和 HL60 细胞株, 可简单、快速地克隆 shRNA, VEGFR₂ 的表达抑制率很高 (99.1%, 化学合成 siRNA 转染表达抑制率 80.9%)。

有效地把 siRNA 导入到体内靶组织, 维持其活性, 是验证 siRNA 有效性及将来成功用于治疗的关键。目前尚无有效的 siRNA 导入方法, 已证实生物载体中病毒载体导入在某些动物模型上有效且作用持续时间长。其中慢病毒和逆转录病毒载体适用于骨髓。近来, 有实验证明应用慢病毒载体导入 siRNA 可显著抑制特定基因表达, 效应呈剂量依赖性, 发生于感染后 72 h, 可持续最少 25 d, 从而提供了研究基因功能和治疗的有力工具^[7]。到目前为止, 基于 HIV 的慢病毒载体是应用于人类造血干细胞最安全有效、发展最好的^[8]。插入 dsDNA oligo 到入门载体而形成的 RNAi 框 (启动子、shRNA 序列和终止子) 能够通过瞬时转染进行检验。一旦 shRNA 序列的活性被确定, RNAi 框可以通过 Gateway[®] 技术转移到 Block-iT[™] 目的载体。本实验证实 VEGFR₂ shRNA 瞬时转染可对 HL60 细胞高效抑制, 可利用慢病毒进行同源重组及转导继续做稳定转染的体外实验。

目前国内外尚无有关人 VEGFR₂ siRNA 作用于人血管内皮细胞和白血病细胞的报道, 亦无用慢病毒载体导入 shRNA 作白血病抑瘤研究的报

道。本实验为进一步在体内外利用长期 RNAi 作用进行抑制白血病的研究打下基础。

参考文献:

- [1] PADRO T, RUIZ S, BEKER K, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patient with acute lymphoid leukemia[J]. Blood, 2000, 95(8):2637- 2643.
- [2] KINI A R, PETERSON L A, TALLMAN M S, et al. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor And inhibition by all- trans retinoic acid[J]. Blood, 2001, 97(12): 3919- 3924.
- [3] DIAS S, HATTORI K, ZHU Z, et al. Autocrine stimulation of VEGFR- 2 activates human leukemic cell growth and migration[J]. J Clin Invest, 2000, 106(4): 511- 521.
- [4] DIAS S, HATTORI K, HEISSIG B, et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR2 signaling pathways is essential to induce remission of xenotransplanted human leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(19) : 10857- 10862.
- [5] 张育, 顾健, 王敏, 等. 白血病患者血管新生及相关因素研究[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(3): 175- 178.
- [6] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567):550- 553.
- [7] TISCOMIA G, SINGER O, IKAWA M, et al. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4):1844- 1848.
- [8] TAKIGAWA Y, NAGANO- FUJII M, DENG L, et al. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome[J]. Microbiol Immunol, 2004, 48(8): 591- 598.

(编辑 张恩健)