

腺病毒介导的 RNA 干扰降低 VEGF 受体 FLT-1, KDR 转录抑制血管形成

许剑锋¹, 沈维干², 彭琬昕²

(1. 江苏省血液中心, 江苏 南京 210042)
(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 本研究用细菌内同源重组的方法构建了针对 VEGF 受体 FLT-1, KDR 的 siRNA 表达重组腺病毒 AdH1-siRNA/FLT-1 和 AdH1-siRNA/KDR, 感染 HUVEC 细胞, 观察两种病毒对 HUVEC 细胞体外增殖和形成微血管的干扰作用. 通过 RT-PCR 实验表明, AdH1-siRNA/FLT-1 和 AdH1-siRNA/KDR 均可特异性地下调血管内皮细胞 (HUVEC) 中的 FLT-1 mRNA 和 KDR mRNA 水平. 与对照组相比, FLT-1 的 mRNA 水平下降为 40%, KDR 的 mRNA 水平下降为 52%. AdH1-siRNA/FLT-1 和 AdH1-siRNA/KDR 对 HUVEC 细胞增殖均有干扰作用, 加入病毒 9 d 后, 对照组的细胞平均计数为 $31.5 \times 10^4/\mu\text{L}$, AdH1-siRNA/FLT-1 干扰病毒对照组为 $28 \times 10^4/\mu\text{L}$, AdH1-siRNA/KDR 干扰组为 $21.5 \times 10^4/\mu\text{L}$. AdH1-siRNA/FLT-1 和 AdH1-siRNA/KDR 对 HUVEC 细胞在 Matrigel 上形成微血管均有干扰作用, 对照组每 HPF 形成微血管数量为 10.75 条, AdH1-siRNA/FLT-1 干扰病毒对照组为 10.25 条, 实验组 AdH1-siRNA/KDR 每 HPF 形成微血管数量为 7 条. 证明 AdH1-siRNA/FLT-1, AdH1-siRNA/KDR 均可干扰血管形成.

[关键词] 血管生成, 血管内皮生长因子受体, RNA 干扰

[中图分类号] Q291 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2014)04-0089-05

Knockdown of FLT-1, KDR by Adenovirus-Delivered Small Interfering RNA Inhibits Angiogenesis

Xu Jianfeng¹, Sheng Weigan², Peng Wanxin²

(1. Jiangsu Province Blood Center, Nanjing 210042, China)
(2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: This study used the homologous recombination technique constructed a recombinant adenovirus AdH1-siRNA/FLT-1 and AdH1-siRNA/KDR targeting FLT-1 and KDR infects human endothelial cells (HUVEC), observation the effect of the adenovirus interfere the proliferation of HUVEC in vitro and the tube formation. Reverse transcription-PCR showed that this adenovirus could specifically decrease level of the FLT-1 and KDR mRNA of HUVEC. Compared with control group, the FLT-1 and KDR mRNA expression of decreased to 40% and 52%. AdH1-siRNA/FLT-1 and KDR can efficiently interfere the proliferation of HUVEC, 9 d after infection of adenovirus, the average cell number of control group and vector group are $31.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ and $28 \times 10^4/\mu\text{L}$, that of groups respectively infected with AdH1-siRNA/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-siRNA/VEGF, there are 7 tubes in the HPE. It is sowed that AdH1-siRNA/FLT-1 and AdH1-siRNA/KDR can also interfere tube formation.

Key words: angiogenesis, FLT-1, KDR, RNAi

在肿瘤的发生发展过程中, 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^[1]。VEGF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。

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^[2]。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 D~45 000 D,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6P 21.3,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的促进因子。

VEGF的生物效应是通过特异性受体VEGFR介导的。VEGFR主要有两种:fms-样酪氨酸激酶受体(fms-like tyrosine kinase, FLT-1)和含激素插入区受体(kinase insert domain containing receptor, KDR)。这两种受体主要在内皮细胞中表达。FLT-1和KDR为跨膜受体,结构相似,均分胞内、跨膜、胞外三部分。FLT-1基因全长7 680 bp,编码区为4 014 bp,编码1 338个氨基酸,KDR基因全长5 821 bp,编码区为4 068 bp,编码1 356个氨基酸。与VEGF结合后,通过自身磷酸化激活进而启动特异性内系统。仅表达KDR的细胞用VEGF活化后可发生分裂,而缺乏KDR仅表达FLT-1的细胞则不能产生增殖反应。FLT-1和KDR同样诱导细胞的迁移,但引起的信号传导途径不同,KDR受体分布广泛,几乎所有的血管内皮细胞都可表达,VEGFR活化导致机体产生血管基底膜分解所需的蛋白酶和特异性的整合素,最后引起细胞增殖和细胞迁移^[4]。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是最近几年发展起来的一门新兴的抑制基因表达的技术,是双链RNA(dsRNA)介导的在基因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^[3]。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^[4]。

我们已经证明,AdH1-siRNA/VEGF可以干扰血管形成,本研究是后续试验,同样采用了腺病毒介导的RNAi技术来验证干扰FLT-1, KDR是否可以干扰血管形成。结果证明,AdH1-siRNA/FLT-1, KDR确实可以干扰血管形成。在本实验中,为了便于比较,我们仍然把前期研究的部分结果一同加入,以便得出更为全面的结论。

1 材料与方法

1.1 实验材料

穿梭载体pShuttle-H1质粒由德国学者Shen C X和Reske S N惠赠,腺病毒骨架pAdEasy-1质粒由美国学者He T C和Vogelstein B惠赠。大肠杆菌BJ5183、DH5 α 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。Trizole RNA提取试剂盒为Invitrogen产品, MMLV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 Premix Ex TaqTM试剂盒。空载重组腺病毒AdCMV/GFP为本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 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%CO₂湿度饱和的条件下进行常规培养。

1.2.2 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 siRNA Target Finder)找出潜在的靶序列,再按 siRNA 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《Molecular Cloning, A Laboratory Manual》^[5].

1.2.3 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% CO₂ 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 15%.

1.2.4 RT-PCR 和实时定量 PCR(Real-time PCR)

HUVEC 细胞接种于 60mm 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 μg 的总 RNA 反转录合成单链 cDNA,取 1 μL 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 Premix Ex Taq™ 产品试剂盒按说明书操作. VEGF 的扩增引物为:5'-TCCTCACACCATTGAAACCA-3'(正义),5'-CACCGATCAGGGAGAGAGAG-3'(反义);FLT-1 的扩增引物为:5'-TTTGGATGAGCAGTGTGAGC-3'(正义),5'-GTGCTGCATCCTTGTGAGA-3'(反义);KDR 的扩增引物为:5'-TGATCGGAAATGACACTGGA-3'(正义),5'-TGCTTCACAGAAGACCATGC-3'(反义);GAPDH 的扩增引物为:5'-AACGGATTTGCTCGTATT-3'(正义),5'-GGAAGATGGTGTATGGGATT-3'(反义).

1.2.5 细胞增殖实验

将 HUVEC 调整到 3×10^5 cells/mL,加入事先以 4% 明胶包被的 24 孔板,每孔 500 μL. 常规培养 24 h 后,按照 2.3 中的方法分别感染 AdH1/null 和 AdH1-siRNA/VEGF,每隔 48 h 换液. 分别在第 3 d,5 d,7 d,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.

1.2.6 体外血管形成实验

按照文献叙述的方法^[6],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 3×10^5 cells/mL,每孔加入 100 μL 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×)的小管数目,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次.

1.2.7 统计学分析

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

2 实验结果

2.1 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 的 mRNA 表达情况. 如图 1 所示,与干扰病毒空载对照相比,AdH1-siRNA/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%,AdH1-siRNA/FLT-1 病毒下降了 40%,AdH1-siRNA/KDR 病毒下降了 52%,而作为内参的 GAPDH 表达没有受影响.

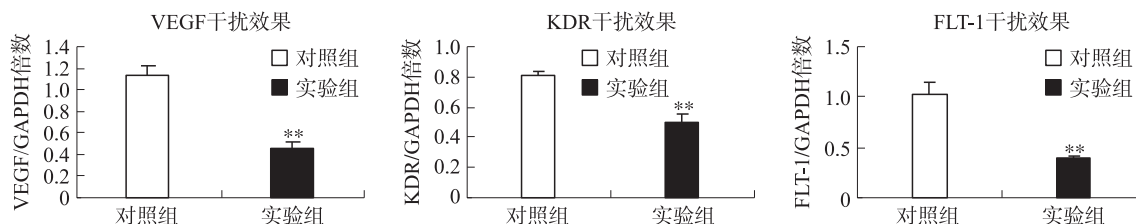


图 1 VEGF,FLT-1,KDR 干扰效果对比

Fig. 1 Comparision of effect VEGF,FLT-1,KDR interfering

Real-time PCR 的结果显示,VEGF 的 mRNA 量下调到 50%,KDR 下调到 52%,FLT 下调到 40%. 腺病毒 AdH1-siRNA/VEGF 明显地抑制 VEGF 的表达,AdH1-siRNA/KDR 明显地抑制 KDR 的表达,AdH1-

siRNA/FLT 明显地抑制 FLT 表达. 而且 AdH1-siRNA/VEGF, AdH1-siRNA/KDR, AdH1-siRNA/FLT 对作为参照的 GAPDH 表达无明显影响. 由此可见, 这 3 种腺病毒表达的抑制作用具特异性.

2.2 AdH1-siRNA/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, 空白对照的细胞增殖情况最好, 空载病毒对 HUVEC 细胞增殖影响不大, AdH1-siRNA/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. HUVEC 细胞的增殖情况如表 1 所示.

图 2 显示了 HUVEC 细胞的增殖情况, 纵坐标单位为 $10^4/\mu\text{L}$. 由图可见, 最上端的折线为空白对照, 细胞的增殖情况最好, 紧靠其下的折线为空载病毒对 HUVEC 细胞增殖的影响也不大, 再靠其下的折线依次为 AdH1-siRNA/VEGF, AdH1-siRNA/KDR 和 AdH1-siRNA/FLT, HUVEC 细胞增殖所受的影响依次变大, 其中以 AdH1-siRNA/FLT 影响最大, 增殖速度下降达 1 倍左右.

2.3 AdH1-siRNA/FLT-1, AdH1-siRNA/KDR 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结构. 实验结果进一步证实腺病毒 AdH1-siRNA/FLT-1, AdH1-siRNA/KDR 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-siRNA/FLT-1, KDR) 的 HUVEC 在 Matrigel 上形成的类微血管数目明显减少 (如图 3).

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-siRNA/KDR 孔平均有 4 ~ 7 条/HPF, AdH1-siRNA/KDR 孔平均有 2 ~ 3 条/HPF, 且类微血管形状也有明显差别 (如图 4). 空白对照孔 (Mock) 的微血管形成数量多, 且交叉处无细胞堆积, 空载病毒 (Vector) 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-siRNA/VEGF 勉强可以形成微血管, 而 AdH1-siRNA/KDR 孔和 FLT-1 孔更少, 并且 AdH1-siRNA/KDR, FLT-1 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.

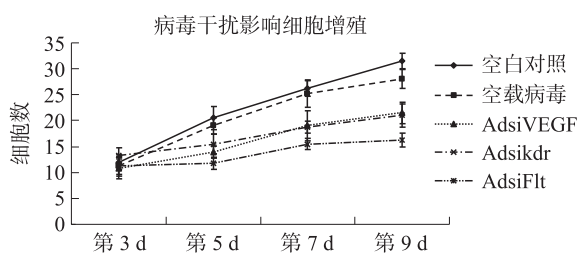


图 2 HUVEC 细胞的增殖情况影响 ($P < 0.01$)

Fig. 2 Effect of the proliferation of HUVEC cells

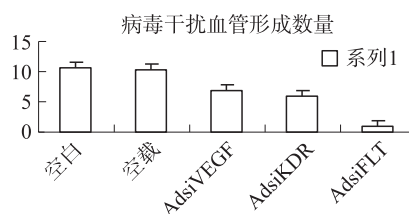


图 3 病毒影响血管形成数量

Fig. 3 Adenovirus interfere tube formation number

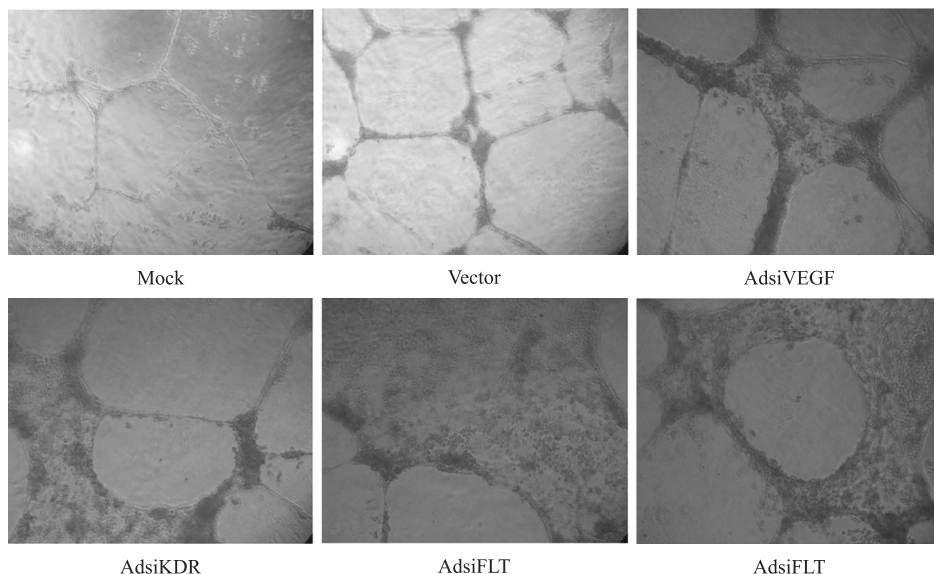


图 4 病毒影响血管形状的改变

Fig. 4 Adenovirus interfere tube shape change

3 结论

通过以上实验可知,用所构建的 AdH1-siRNA/VEGF、AdH1-siRNA/FLT-1、AdH1-siRNA/KDR 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,对 VEGF 受体干扰后效果更明显,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-siRNA/VEGF、AdH1-siRNA/FLT-1、AdH1-siRNA/KDR 都对 HUVEC 细胞形成血管有明显的抑制作用,VEGF 受体干扰相比 VEGF 受干扰,血管形成的形态改变更为明显。

4 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.其中,RNA 干扰是较有前景的一种方法,Zhang 等^[7]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 RNAi 能有效地抑制肿瘤血管生成.Reich 等^[8]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 siRNA 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 RNAi 的方法抑制肿瘤血管生成是一种重要的选择.

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 及其受体 FLT-1,KDR 的 SiRNA 表达重组腺病毒 AdH1-siRNA/VEGF,感染 HUVEC 细胞,该实验中,AdH1-siRNA/VEGF 和 AdH1-siRNA/FLT-1,AdH1-siRNA/KDR 病毒均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%,AdH1-siRNA/FLT-1 病毒下降了 40%,AdH1-siRNA/KDR 病毒下降了 52%,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 siRNA 设计软件随机设计而成,因此,50%、40%、52% 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-siRNA/KDR,FLT-1 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相比干扰 VEGF 均有更强的作用.因此,我们认为针对 VEGF 受体 KDR,FLT-1 的 siRNA 表达重组腺病毒确实可以更好地干扰 HUVEC 细胞内的 VEGFR,并对 HUVEC 细胞体外增殖和形成微血管有更强的干扰作用,因此,腺病毒介导的 RNA 干扰技术降低 VEGFR 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.

[参考文献]

- [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, A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: 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,Mohamed-Hadley A,et al, Vector-based RNAi, a novel tool for isofom-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer[J]. Biochem Biophys res Commun,2003,303:1 169-1 178.
- [8] Reich S J, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhabits ocular neovascularization in a mouse modal[J]. Mol Vis,2003(9):210-216.

[责任编辑:黄 敏]