

RNA 干扰对神经母细胞瘤细胞 VEGF - A 的 mRNA 表达的影响

张雁冰 刘朝阳 卢 其 周小渔

【摘要】 目的 构建表达 VEGF - A 的短发夹 RNA 真核表达载体,并通过其介导的 RNA 干扰作用,研究对人神经母细胞瘤细胞株 IGR - N - 91 细胞中 VEGF - A 的 mRNA 表达的影响。**方法** 根据 VEGF - A 的 cDNA 序列合成两对寡核苷酸片段,退火后分别插入真核表达载体组成重组质粒。对重组质粒进行 PCR、测序鉴定验证后,经 Western Blot 筛选 RNA 干扰效果最佳的质粒,然后将该质粒转染人神经母细胞瘤细胞株 IGR - N - 91。转染 48 h 后提取总 RNA,逆转录为 CDNA,经 RT - PCR 半定量检测 VEGF - A mRNA 的表达水平。**结果** 成功构建含有 VEGF - A 的 RNA 干扰片段真核表达载体,经 Western Blot 筛选后分别得到 RNA 干扰效果最佳的片段。RT - PCR 结果表明质粒转染人神经母细胞瘤后 VEGF - A 的 mRNA 的表达升高。**结论** 成功构建含有人 VEGF - A 的 RNA 干扰片段的真核表达载体,该重组质粒转染人神经母细胞瘤 IGR - N - 91 细胞后 VEGF - A 的 mRNA 表达升高。

【关键词】 神经母细胞瘤; 血管内皮生长因子 A

The effect of VEGF - A mRNA expression in neuroblastoma with VEGF - A RNA interference. ZHANG Yan-bing, LIU Zhao-yang, LU Qi, et al. Hunan Children's Hospital Department I of General Surgery, Changsha, 410007, China

【Abstract】 Objective To construct the expression VEGF - A of the short hairpin RNA eukaryotic expression vector, and mediated through its role in RNA interference research on human neuroblastoma cell line IGR - N - 91 cells in the VEGF - A the mRNA expression. **Methods** According to VEGF - A cDNA sequences synthesis two pairs of oligonucleotide; then annealed respectively, inserted into the eukaryotic expression vector comprising the recombinant plasmid. Recombinant plasmid for PCR, sequencing and identification of validated screening by Western Blot, and then will be screened from the best RNA interference plasmid transfected human neuroblastoma cell line IGR - N - 91. The total RNA extracted when the plasmid was transfected for 48h, then reversed to CDNA. By semi - quantitative RT - PCR of VEGF - A mRNA expression levels were detected. **Results** We successfully constructed eukaryotic expression vector containing VEGF - A RNA interference fragments. The recombinant plasmids transfected into human neuroblastoma cell line IGR - N - 91, which VEGF - A mRNA was overexpressed measuring by semi-quantitative RT - PCR. **Conclusions** We successfully constructed eukaryotic expression vector containing human VEGF - A RNA interference fragments. The recombinant plasmids transfected into human neuroblastoma cell line IGR - N - 91 significantly overexpressed VEGF - A mRNA .

【Key words】 Neuroblastoma; Vascular Endothelial Growth Factor A

神经母细胞瘤是儿童常见的恶性实体肿瘤之一,发病率约 1/10 万,治疗效果不理想,生存率始终徘徊在 15% ~ 30%^[1]。血管生成对恶性肿瘤的生长和转移十分重要。为此,肿瘤细胞表达多种细胞因子破坏微环境中促血管生成和抑制血管生成的平衡。VEGF 是最重要的促血管生成因子,且在

人神经母细胞瘤及其细胞系中呈现高表达^[1-2]。本实验通过构建 VEGF - A RNA 干扰真核表达载体并转染人神经母细胞瘤细胞株 IGR - N - 91,观察其对 VEGF - A 表达的影响。

材料和方法

一、细胞培养

人神经母细胞瘤细胞系 IGR - N - 91 (购自上海

中科院细胞库)细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,在 37 ℃,5% CO₂ 培养箱内培养。

二、重组质粒构建

表 1 设计并合成的序列

Table 1 The sequence was designed and synthesized

序号	接头 1	茎	环	茎	接头 2
Psc287	TCGAGAAAAAA	aaGTGGTGAAGTTCATGGATG	TTCAAGAGA	CATCCATGAAC TTCACCAct	A
Psc288	TCGAGAAAAAA	aaTGCAGACCAAAGAAAGATA	TCTCTTGAA	TATCTTTCTTTGGTCTGCAtt	A
PscNC	TCGAGAAAAAA	TTCTCCGAACGTGTCTACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	A

质粒 pGCL-GFP 经 Hpa I 和 Xho I 双酶切,酶切产物和寡核苷酸片段退火产物经低熔点琼脂糖胶回收后混合经 T4 DNA 连接酶过夜连接形成质粒。

三、重组质粒扩增、鉴定、抽提、筛选

将载体质粒转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布 AMP 平板倒置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中过夜培养,挑选单克隆于 3 ~ 5 mL LB 培养液(AMP 终浓度 50 mg/L)振荡培养 16 ~ 18 h。应用基因公司质粒小量抽提试剂盒按说明书操作抽提质粒后经 PCR 鉴定并测序。结果正确后应用 Qiagen 公司 Plasmid mega kit 抽提质粒,鉴定后 -20 ℃ 保存备用^[3]。将 VEGF-A 过表达质粒分别与 psc287、psc288、pscNC 共转染 293T 细胞应用 Western Blot 筛选抑制效果明显的质粒。

四、重组质粒转染人神经母细胞瘤细胞 IGR-N-91

转染前 1 d,将 IGR-N-91 细胞用 0.25% 胰酶消化,细胞用含血清培养基稀释,按 5 × 10⁴/孔接种于 24 孔板中。当细胞长至约 2 × 10⁵/孔时,吸去培养液并用不含血清的 DMEM/F12 培养基清洗细胞 2 ~ 3 遍,分别以 0.5 μg/孔、1 μg/孔、2 μg/孔质粒在不含血清的 DNEN/F12 培养基中与 Lipofectin2000(购自 Invitrogen 公司)按 1:3 混合,室温下孵育 30 min 后转染 IGR-N-91 细胞,具体操作按脂质体 Lipofectin2000 试剂说明书进行,同时设置未转染为阴性对照,每组孔数为 3(*n* = 3)。于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱内培养 6 h 后吸去上清加入正常体积含血清培养液继续培养 48 h 后荧光显微镜下观察并拍照。

五、RNA 抽提

将细胞从 24 孔板上刮下,2 000 g、5 min 离心弃去培养液,每 5 ~ 10 × 10⁶ 细胞加入 1 mL TRIzol,用移液管反复吹打将细胞溶解液后加入一新的离心管中。室温孵育 15 min,每个标本中加入 0.2 mL 氯仿(每 1 mL TriPure),振摇 15 s。室温孵育 2 ~

根据 Reynolds 等介绍的原则,以人 VEGF - A 的 cDNA 序列(GB: NM_00102536)为模板设计合成两段序列(见下表):

15 min,12 000 g、15 min,4 ℃。溶液将分为三相,将上层无色水相移入另一离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇。颠倒混匀,室温孵育 5 ~ 10 min, 12 000 g、10 min,4 ℃,弃上清。加入 1 mL 75% 酒精,充分混匀。7 500 g、5 min,4 ℃,弃上清,风干。用 DEPC 水重悬 RNA 颗粒,55 ~ 60 ℃,15 min,测定 A_{260/280} 比值后反转录为 cDNA,反转录所用的引物为随机引物保存于 -80 ℃。

六、半定量 RT-PCR

1. 分别设计两对引物

VEGF-A1

Froward:5' -CTTGCCTTGCTGCTCTACC-3'

Reverse:5' -ACACAGGATGGCTTGAAGATG-3'

扩增片断大小为 200 bp,位于靶序列的前方未跨过靶序列。

VEGF-A2

Froward:5' -cagcgagctactgccatccaatcgaga-3'

Reverse:5' -gcttgtcacatctgcaagtacgttcgttta-3'

扩增片断大小为 547 bp,跨过靶序列。

表 2 PCR 体系
Table 2 PCR components

cDNA	1 μL
引物	2 μL
Max mix	12.5 μL
灭菌水	9.5 μL
总体积	25 μL

表 3 PCR 反应条件
Table 3 PCR reaction conditions

95 ℃	5'	25 cycle
95 ℃	30"	
55 ℃	30"	
72 ℃	25"	
72 ℃	1'	

GADPH
Froward:5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'
Reverse:5'-TAGCCCAGGATGCCCTTGAG-3'
作为内参照,扩增片段大小为 100 bp。

2. RT-PCR 体系,反应条件
产物再经 2% 琼脂糖凝胶 110 V,35 min 电泳分析鉴定并拍照。

结 果

一、重组质粒 psc287、psc288 的鉴定和重组质粒的筛选。

psc287、psc288 质粒 PCR 扩增后电泳可见 384 bp 的条带,空载质粒为 322 bp 条带,挑选阳性

克隆菌送生物技术有限公司测序,测序结果包含目的基因序列。PCR 结果电泳图片见图 1。

经 Western Blot 筛选证实 psc288 对 VEGF-A 的抑制效果优于 psc27,故选择 psc288 转染 IGR-N-91 细胞,见图 2。

二、质粒 psc288 转染人神经母细胞瘤细胞 IGR-N-91

转染 48 h 后经流式细胞仪检测表达 EGFP 细胞数达到 85% 以上,见图 3。

三、半定量 RT-PCR 检测转染后 VEGF-A 的 mRNA 表达水平

引物 VEGF-A1 的结果,见图 4。

引物 VEGF-A2 的结果,见图 5。

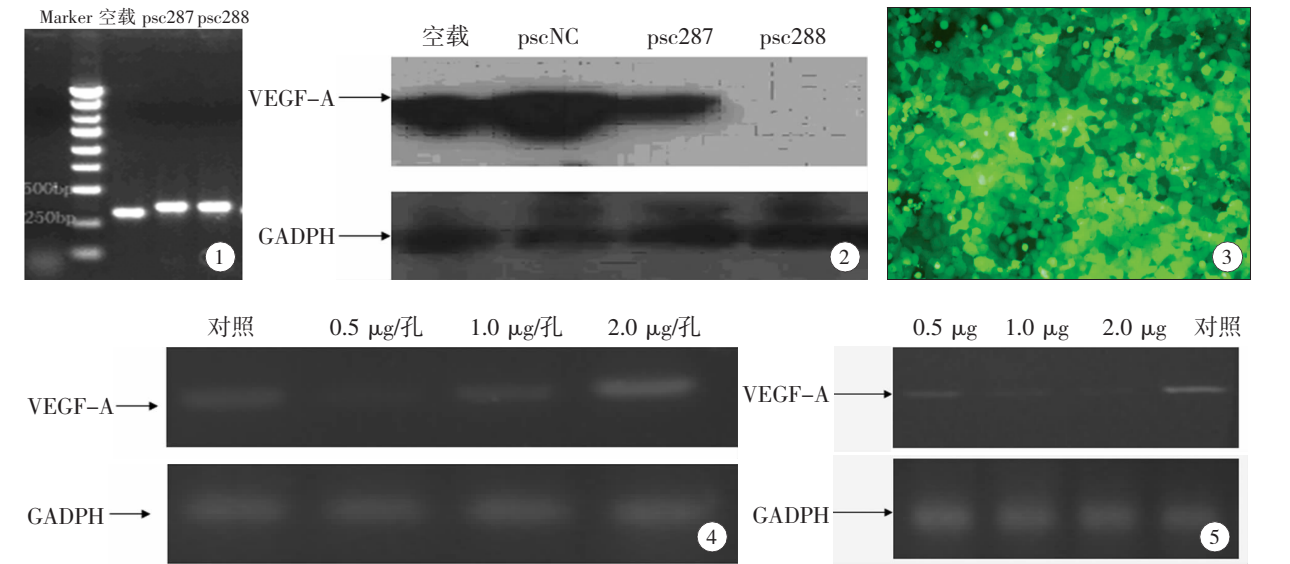


图 1 泳道 1 电泳阴性对照、泳道 2 Marker、泳道 3 空载体 PCR 产物、泳道 4 psc287PCR 产物、泳道 5 psc288PCR 产物。可见于 250 ~ 500 bp 之间有一明显条带; 图 2 WB 筛选的结果,可见 psc288 对 VEGF-A 有显著抑制; 图 3 呈亮绿色为成功转染 psc288 质粒 48 h 后的 IGR-N-91 细胞,100 ×;图 4 VEGF-A 的 mRNA 表达量随着转染质粒量的增多而升高; 图 5 VEGF-A 的 mRNA 表达量随着转染质粒量的增多而降低。

Figure 1 Sequence is negative control, Marker, empty vector PCR products, psc287 PCR products, psc288 PCR products. Stripe between 250 bp to 500 bp is visible; Figure 2 VEGF-A was significantly inhibited by psc288; Figure 3 psc288 plasmid was successfully transfected after 48h IGR-N-91 cells under a fluorescence microscope was bright green, 100 ×; Figure 4 VEGF-A mRNA expression increased with the increase in the amount of transfected plasmid; Figure 5 VEGF-A mRNA expression increased with the increase in the amount of transfected plasmid.

讨 论

大量研究证明了肿瘤的生长、复发、转移与新生血管的形成关系密切,肿瘤的增殖程度与肿瘤新生血管的形成呈正相关^[4-5]。而 VEGF 是肿瘤新生血管形成最有效和特异的因子。同样,高度恶性的神经母细胞瘤也通过分泌大量的 VEGF 促进细胞的增

殖和转移,VEGF 表达增强意味着神经母细胞瘤细胞增殖速度快、转移率高^[6-8]。因此,VEGF 便成为肿瘤治疗的一个靶点。阻断 VEGF 的作用可能足以抑制绝大多数的血管生成作用,不仅直接抑制了血管生成作用,而且抑制了 VEGF 与其它血管生长因子的协同作用^[9]。

本实验中,我们开始也设想应用 RNA 干扰技术,抑制神经母细胞瘤细胞分泌 VEGF-A,从而达到

抑制肿瘤血管生成,细胞增殖等目的。所以我们首先合成 shRNA 的 DNA 序列,插入真核表达载体。经 PCR,测序鉴定目标准确无误地插入载体后,与 VEGF-A 的过表达质粒共转染 293T 细胞,进行干扰效果最佳靶点的筛选。经 Western Blot 检测,确定 psc288 质粒对 VEGF-A 的干扰效果最好。随后转染神经母细胞瘤细胞 IGR-N-91,由 psc288 质粒上所携带的报告基因(EGFP)确定质粒转入细胞如图 3 所示。转染效率达到 80% 以上时抽提 RNA,经 RT-PCR 检测 VEGF-A 的 mRNA 水平。引物 VEGF-A2 扩增的结果与预期的结果一致:随着转染质粒数量的增加,VEGF-A 的 mRNA 表达水平下降。但是,引物 VEGF-A1 扩增的结果却于预期结果恰恰相反即随着转染质粒数量的增加,VEGF-A 的 mRNA 表达水平不但没有下降反而上升。

该怎么样看待,理解两个截然相反的结果呢?从共转染 293T 细胞,进行筛选最佳靶点的结果来看。Psc288 对 VEGF-A 的干扰效果最好,在转染 IGR-N-91 时也应该产生相同的结果,从引物 VEGF-A2 扩增的结果(图 4)也能看出,转染 psc288 质粒确实对 VEGF-A 起到了 RNA 干扰的作用。引物 VEGF-A1 所扩增的片段位于靶序列的前方,未跨过靶序列即断裂点;而引物 VEGF-A2 所扩增的片段位于靶序列,跨过断裂点。引物 VEGF-A2 所扩增的片段的亮度间接反映了细胞内完整的 VEGF-A 的 mRNA 分子的数量;引物 VEGF-A2 所扩增的片段的亮度间接反映了细胞内所有 VEGF-A 的 mRNA 分子的数量。也就是说随着转染质粒数量的增加,VEGF-A 的 mRNA 表达水平也在升高。表现出来的 VEGF-A 的 mRNA 表达水平下降不过是完整的 VEGF-A 的 mRNA 分子的数量下降,但是细胞内所有 VEGF-A 的 mRNA 分子的数量是增加的。经多次独立重复实验,结果均一致,具体机制目前仍不清楚。

RNA 干扰的靶序列均选在 mRNA 分子的蛋白编码区,在剪切后无法翻译或不能翻译为完整肽链,从而发挥转录后抑制的作用。结合 VEGF165 的 cDNA 序列分析可知:在质粒 psc288 的靶序列前方即为 5' 非编码区(5' UTR)和部分编码区(CDS),也就是说在转染质粒 psc288 时能产生更多的 VEGF mRNA 的 5' UTR。

有学者^[10]发现,VEGF mRNA 的 5' UTR 拥有抗

细胞凋亡的活性。该 5'UTR 介导的抗细胞凋亡活性不受蛋白质合成抑制剂(放线菌酮)的影响。基因芯片和实时定量 PCR 分析表明,表达 VEGF 5'UTR 的肿瘤可以上调抗凋亡基因、多药耐药基因、生长促进基因的表达,而使促凋亡基因表达下调。这些结果表明,肿瘤细胞有一个生存系统,并由 VEGF mRNA 调节,意味着 VEGF mRNA 及其蛋白都可能协同促进肿瘤细胞的恶性倾向。这也部分解释了临床试验中单独使用抗 VEGF 治疗,效果不如标准的化疗。

参考文献

- 1 Keith L Lee, Jian F Ma, and Linda D. Shortliffe. Neuroblastoma: Management, recurrence, and follow-up [J]. Urol Clin N Am, 2003, 30(4): 881-890.
- 2 Langer I, Vertongen P, Perret J, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastomas [J]. J Med Pediatr Oncol, 2000, 34(6): 386-393.
- 3 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [J]. 黄培堂译. 第 3 版. 科学出版社, 2002; 1540-1980.
- 4 Puppo M, Battaglia F, Ottaviano C, et al. Topotecan inhibits vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity induced by hypoxia in human neuroblastoma by targeting hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 1974-1984.
- 5 Rössler J, Taylor M, Geoerger B, et al. Angiogenesis as a target in neuroblastoma [J]. Eur J Cancer, 2008, 44(12): 1645-1656.
- 6 Ribatti D, Marimpietri D, Pastorino F, et al. Angiogenesis in neuroblastoma [J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1028: 133-142.
- 7 Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. Angiogenesis and anti-angiogenesis in neuroblastoma [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(6): 750-757.
- 8 Chlenski A, Liu S, Cohn SL. The regulation of angiogenesis in neuroblastoma [J]. Cancer Lett, 2003, 18: 197(1-2): 47-52.
- 9 Shusterman S, Maris JM. Prospects for therapeutic inhibition of neuroblastoma angiogenesis [J]. Cancer Lett, 2005, 18: 228(1-2): 171-179.
- 10 Rastinejad F, Conboy MJ, Rando TA, et al. Tumor suppression by RNA from the 3' untranslated region of α -tropomyosin [J]. Cell, 1993, 75(6): 1107-1117.