

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)02-0154-03

沉默激酶功能区受体抑制前列腺癌 PC-3 细胞的裸鼠体内成瘤能力

谢国旗¹, 易伟国¹, 刘 新¹, 郭照静², 缪应业^{2*}(中国人民解放军第 152 中心医院: ¹医务处; ²检验科, 河南 平顶山 467000)

[摘要] 目的 研究激酶功能区受体(KDR)基因表达沉默后对前列腺癌 PC-3 细胞裸鼠体内成瘤能力的影响。方法 将 15 只 5 周龄 BALB/c 雄性裸鼠随机分为干扰组、阴性质粒组和未转染组, 每组 5 只。分别接种构建的 pSilencer 3.1-KDR siRNA 表达质粒转染 PC-3 细胞、阴性对照质粒 pSilencer3.1-NC 转染 PC-3 细胞以及未转染的 PC-3 细胞于裸鼠皮下; 观察各组 PC-3 细胞在裸鼠体内成瘤率、瘤体生长速度以及平均瘤质量等方面的变化, RT-PCR 和 Western blot 技术检测瘤体 KDR 基因和蛋白表达。结果 pSilencer3.1-KDR 质粒转染组的裸鼠瘤体生长速度明显慢于未转染组和 pSilencer3.1-NC 质粒转染组; 与未转染组和 pSilencer3.1-NC 组相比, pSilencer3.1-KDR 组肿瘤的生长受到明显抑制, 平均体积较小(0.28 cm^3 vs 0.721 cm^3 , 0.715 cm^3 , $P < 0.01$), 平均瘤质量较轻(0.14 g vs 0.648 g , 0.635 g , $P < 0.01$); 裸鼠肿瘤组织中 KDR mRNA 和蛋白的表达明显降低。结论 RNAi 介导的 KDR 基因沉默可显著影响 PC-3 细胞裸鼠体内的瘤体生长速度, KDR 有可能成为肿瘤治疗的新靶点。

[关键词] 裸鼠; KDR; 前列腺癌; PC-3 细胞; RNA 干涉

[中图分类号] R392.33, R737.25 **[文献标志码]** A

KDR silencing suppresses the tumor growth of prostate cancer cell line PC-3 in nude mice

XIE Guoqi¹, YI Weiguo¹, LIU Xin¹, GUO Zhaojing², MIAO Yingye^{2*}¹Department of Medical Affairs; ²Department of Clinical Laboratory, Chinese PLA 152nd Hospital, Pingdingshan 467000, China

[Abstract] **Objective** To study the change in the tumor growth of prostate cancer cell line PC-3 in nude mice xenografts after kinase domain receptor (KDR) silencing by RNA interference. **Methods** A total of 15 5-week-old male nude mice were randomly divided into normal PC-3 cell group (negative control), RNA interference group and pSilencer3.1-NC group, with 5 mice in every group. The nude mice were respectively treated with subcutaneous injection of 0.5 mL ($2.0 \times 10^7/\text{mL}$) normal PC-3 cells, and the same volume of PC-3 cells transfected with pSilencer3.1-KDR and pSilencer3.1-NC vectors, respectively. By measuring the tumor volumes every 3 d and the tumor weights after 4 weeks, we recorded tumor formation rate, tumor growth rate and mean tumor weight. The expression of KDR at both mRNA and protein levels was detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Tumor growth was significantly slower in the pSilencer3.1-KDR group than in the negative control group and the pSilencer3.1-NC group. After 4 weeks, the mean volume of tumor in the pSilencer3.1-KDR group was significantly smaller than that in the other two groups (0.28 cm^3 vs 0.715 cm^3 and 0.721 cm^3 , $P < 0.01$), so was the mean weight of tumor (0.14 g vs 0.635 g and 0.648 g , $P < 0.01$). In addition, KDR mRNA and protein expressions significantly decreased. **Conclusion** The tumor growth in nude mice xenografts can be efficiently inhibited by KDR silencing mediated by RNAi, so the suppression of KDR expression might be a promising strategy for the treatment of human prostate cancer.

[Key words] nude mice; KDR; prostate cancer; PC-3 cells; RNA interference

血管内皮生长因子受体 II, 又称激酶功能区受体 (vascular endothelial growth factor II, VEGFR2/kinase domain receptor, KDR), 其在血管内皮和部分肿

瘤细胞上特异性表达, 对于 VEGF 的信号转导及血管内皮生成起主导作用, 在肿瘤发生、发展中起重要的调节作用。研究表明, 人前列腺癌细胞中有 VEGF

收稿日期: 2012-11-02; 接受日期: 2012-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(31172166, 81171367)

作者简介: 谢国旗(1967-), 男, 河南襄城人, 副主任医师, 硕士

Tel: 13849556306; E-mail: xieq152@126.com

*Corresponding author, 缪应业, E-mail: myy7591@sina.com

和KDR表达,存在VEGF-KDR自分泌途径,与前列腺癌细胞的生长和转移密切相关^[1-2]。所以,抑制KDR的表达,可以在两个水平上抑制肿瘤生长。为了观察RNA干涉(RNA interference, RNAi)介导的KDR基因沉默对前列腺癌PC-3细胞裸鼠体内成瘤能力的影响,本研究采用构建的pSilencer3.1-KDR和阴性对照质粒pSilencer3.1-NC转染PC-3细胞后,将细胞接种于裸鼠皮下,观察转染后的PC-3细胞在裸鼠体内成瘤能力的变化,探讨siRNA对KDR基因特异性沉默及对瘤体增殖的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 去内毒素质粒提取试剂盒和RT-PCR试剂盒均购自Promega公司;转染试剂Lipofectamine™2000为Invitrogen公司产品;小鼠抗人KDR单克隆抗体(mAb)购自RD公司;山羊抗小鼠二抗、DAB显色液均购自武汉博士德公司;小鼠抗人GAPDH mAb及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG购自上海康成生物有限公司;PCR引物TaKaRa生物有限公司合成;前列腺癌PC-3细胞系购自中科院上海细胞所;SPF级雄性BALB/c裸鼠,5周龄,体质量20~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 KDR特异性shRNA表达质粒 KDR特异性siRNA表达质粒为本实验室构建的pSilencer3.1-KDR(KDR序列为AAGCGGCTACCACTCCGGATA位于KDR基因编码区3906~3925),重组质粒可有效的抑制PC-3细胞中KDR基因的表达^[3]。为了检测转染效率,以含绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的空真核表达质粒pEGFPN2同步转染PC-3细胞,转染24 h后荧光倒置显微镜下观察转染效率。阴性对照质粒pSilencer3.1-H1 neo(negative control, pSilencer3.1-NC),由Ambion公司提供,含有与任何已知序列不同源的shRNA编码序列。

1.2.2 重组质粒转染PC-3细胞 生长于250 mL培养瓶中密度为90%的PC-3细胞15瓶,分为3组,每组5瓶,按说明书方法分别转染pSilencer3.1-KDR重组质粒和阴性对照质粒pSilencer3.1-NC,剩余1组为未转染对照组,质粒用量为12 μg,脂质体用量为30 μL。

1.2.3 裸鼠实验分组 15只雄性BALB/c裸鼠,5周龄,体质量20~22 g,随机分为3组,每组5只,分别为pSilencer3.1-KDR重组质粒和pSilencer3.1-NC阴性对照质粒转染组及未转染对照组。

1.2.4 转染后PC-3细胞接种裸鼠 转染后24 h,经荧光倒置显微镜下观察pEGFPN2质粒同步转染的PC3细胞,结果显示,此次转染的效率约为65%。转染后48 h,消化各组PC-3细胞,调节细胞密度为 2.0×10^7 /mL,充分混匀后,每只裸鼠右后肢皮下接种细胞悬液0.5 mL。

1.2.5 肿瘤体积变化和瘤质量 各组荷瘤裸鼠肿瘤体积变

化:每隔3 d用游标卡尺测量各组裸鼠瘤体长(a)、宽(b)、高(c),按下式计算瘤体积(V)。瘤体积 $V = (\pi/6)(abc)$,各组取平均值,绘制裸鼠肿瘤体积变化图。30 d后,处死小鼠剖取瘤组织,称量瘤体质量。

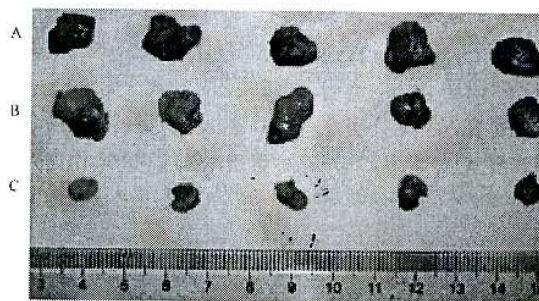
1.2.6 RT-PCR检测KDR mRNA表达水平的变化 提取总RNA并定量,用DNA酶I处理总RNA以去除DNA污染,取等量的RNA反转录后进行PCR。pSilencer3.1-KDR位点PCR引物正义链:5'-ACGGACAGTGGTATGGTT-3',反义链:5'-CGAGTCAGGCTGGAGAAT-3',产物长度279 bp。内参照β-肌动蛋白PCR引物正义链:5'-GCTCGCTCGCAGAACGGCTC-3',反义链:5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3',产物长度353 bp。PCR产物经琼脂糖电泳后于FR200图像分析系统分析。以待检基因条带与内参条带β-肌动蛋白的积分光密度比值作为目的基因的相对表达量。RT-PCR产物比值=KDR mRNA灰度值/内参照mRNA灰度值。

1.2.7 Western blot检测KDR蛋白表达水平 分别对3组的肿瘤组织进行蛋白提取,调整蛋白浓度至相同水平进行SDS-PAGE电泳,转膜、封闭;小鼠抗人KDR(1:1 000),小鼠抗人GAPDH(1:1 000),4℃过夜,加辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(1:1 000)室温孵育1 h;洗涤、DAB显色30 min。图像扫描分析,Western blot产物比值=KDR蛋白灰度值/GAPDH内参照灰度值。

1.2.8 统计学分析 实验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS10.0统计分析软件,各实验组数据进行方差分析,试验组间的多重比较使用SNK-q检验,检验水准以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组裸鼠的瘤质量比较 三组裸鼠的成瘤率都为100%;pSilencer3.1-KDR质粒转染组的平均瘤质量为0.140 g, pSilencer3.1-NC转染组平均瘤质量为0.635 g,未转染组为0.648 g, pSilencer3.1-KDR质粒转染组平均瘤质量明显低于两对照组($P < 0.01$)。两对照组间无显著性差异($P > 0.05$,图1、2)。

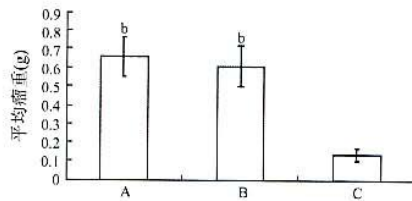


A: 未转染组; B: pSilencer3.1-NC; C: pSilencer3.1-KDR.

图1 各组裸鼠的肿瘤大小

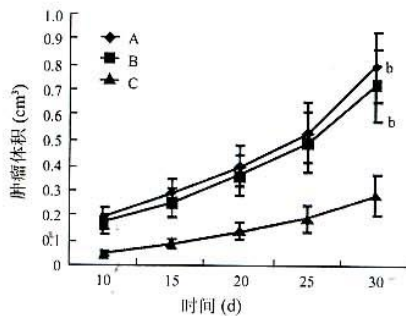
2.2 各组裸鼠的肿瘤体积生长变化 pSilencer3.1-

KDR 质粒转染组的肿瘤生长速度明显慢于未转染组和 pSilencer3.1-NC 质粒转染组,而未转染组和 pSilencer3.1-C 质粒转染组比较则无明显差别(图3)。实验结束时, pSilencer3.1-KDR 质粒转染组肿瘤平均体积为 0.28 cm^3 ,未转染组和 pSilencer3.1-NC 质粒转染组的肿瘤平均体积分别为 0.721 cm^3 和 0.715 cm^3 , pSilencer3.1-KDR 质粒转染组平均体积明显低于两对照组 ($P < 0.01$),两对照组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。



A: 未转染组; B: pSilencer3.1-NC; C: pSilencer3.1-KDR. $bP < 0.01$ vs pSilencer3.1-KDR.

图2 各组裸鼠平均瘤质量

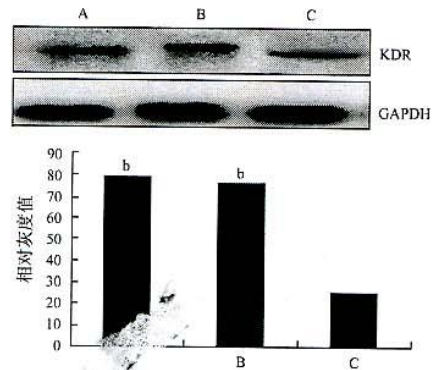


A: 未转染组; B: pSilencer3.1-NC; C: pSilencer3.1-KDR. $bP < 0.01$ vs pSilencer3.1-KDR.

图3 各组裸鼠的肿瘤生长曲线

2.3 KDR mRNA 在裸鼠肿瘤组织中的表达 pSilencer3.1-KDR 质粒转染组、未转染组和 pSilencer3.1-NC 质粒转染组 KDR mRNA 相对表达值分别为 (31.6 ± 2.3) 、 (89.6 ± 2.1) 、 (86.9 ± 2.5) ,与两对照组相比, pSilencer3.1-KDR 质粒转染组 KDR mRNA 表达明显减少 ($P < 0.01$),两对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 KDR 蛋白在裸鼠肿瘤组织中的表达 KDR 蛋白在 pSilencer3.1-KDR 质粒转染组、未转染组和 pSilencer3.1-NC 质粒转染组相对值分别为 (24.6 ± 3.6) 、 (78.4 ± 4.1) 、 (75.9 ± 3.9) ,与两对照组相比, pSilencer3.1-KDR 质粒转染组 KDR 蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$),两对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图4)。



A: 未转染组; B: pSilencer3.1-NC; C: pSilencer3.1-KDR. $bP < 0.01$ vs pSilencer3.1-KDR.

图4 Western blot 检测裸鼠肿瘤组织中 KDR 蛋白表达

3 讨论

VEGF 与其受体在肿瘤血管形成中起着关键的调节作用^[4-5],能刺激血管内皮细胞分裂、增殖,诱导血管生成,有助于肿瘤的生长和转移。VEGFR 家族的成员包括: VEGFR1 (Flt-1)、VEGFR2 (KDR/Flk-1)、VEGFR3 (Flt-4), KDR 是发挥功能的主要受体^[6], KDR 不仅表达于肿瘤组织的血管内皮细胞而且表达于肿瘤细胞的胞膜和(或)胞质,提示肿瘤细胞分泌的 VEGF 不仅以旁分泌方式作用于血管内皮细胞并诱导血管新生,也可通过自分泌途径与自身表面的受体结合而促进细胞生长或迁移、抑制细胞凋亡。张晓静等^[7]用化学修饰的 siRNA 介导的 RNAi 在体内外成功抑制 KDR 靶基因的表达和乳腺癌细胞 MCF-7 增殖,裸鼠体内实验显示 siRNA 治疗组肿瘤组织的生长受到明显抑制;Huang 等^[8]用 Pj-8 (苯并咪唑衍生物)通过封闭 VEGF 和 KDR 的磷酸化,在体外可有效抑制 HUVECs 增殖、迁移和血管的形成,在体内有效抑制 MDA-MB-231 细胞移植瘤的血管生成;Venkatraman Manickam 等^[9]通过 RNA 干扰高尔基体上的突触融合蛋白 6 来抑制 KDR 的表达,从而降低 VEGF 诱导的细胞增殖和迁移,并在鼠耳血管模型中,通过抑制突触融合蛋白 6 的表达,显著地降低 VEGF 诱导的新生血管的形成。以上研究表明阻断 VEGF 与 KDR 的相互作用就能抑制血管的形成、可能具有抑制肿瘤生长的作用。

在体外实验的基础上,通过建立 PC-3 裸鼠肿瘤模型,来观察 siRNA 表达载体 pSilencer3.1-KDR 体内的抗癌活性。把瞬时转染各组 siRNA 表达载体 pSilencer3.1-KDR 的 PC-3 细胞接种于裸鼠的右后肢皮下,观察肿瘤的生长情况。结果发现: pSilencer3.1-KDR 与其余各组相比,肿瘤的生长受到明显抑制,瘤体较

(下转 160 页)