

表达血管内皮生长因子-siRNA 及双自杀基因 yCDglyTK 的联合基因载体构建及其应用研究*

叶 玲¹⁾ 张桂英^{1)**} 刘 霆^{1)**} 陈选民¹⁾ 易 红²⁾ 肖志强²⁾ 冷爱民¹⁾ 彭 杰¹⁾

(¹⁾中南大学湘雅医院消化内科, 长沙 410008; ²⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008)

摘要 构建了新型联合基因载体 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK, 研究其在人胃癌细胞系 SGC7901 细胞中的表达和杀伤作用。构建靶向血管内皮生长因子(VEGF)的干扰质粒 pGenesil-VEGF-siRNA, 采用 PCR 法从中扩增 siRNA 表达框(含 U6 启动子), 亚克隆至双自杀基因载体 pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK, 构建联合基因质粒 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK; 通过酶切、测序等鉴定重组质粒; 以磷酸钙纳米颗粒为载体, 将干扰质粒、双自杀基因质粒及联合基因质粒转染 SGC7901 细胞, RT-PCR、Western-blot 验证目的基因表达; MTT 法检测转染细胞对 5- 氟胞嘧啶(5-FC)的敏感性。结果表明: 酶切及测序证实联合基因载体 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK 构建成功; SGC7901 细胞转染联合基因质粒后, RT-PCR、Western-blot 证实融合自杀基因表达, 而 VEGF 基因表达下调; 在前体药物 5-FC 作用下, 转染联合基因组细胞存活率最低, 与其他组比较有统计学差异。成功构建联合基因载体 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK, 初步验证靶向 VEGF 的 RNA 干扰与双自杀基因系统具有协同效应。

关键词 RNA 干扰, 自杀基因, 胃癌, 联合基因治疗

学科分类号 R57

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00598

自杀基因治疗(suicide gene therapy)是指将编码某种特殊酶的基因导入肿瘤细胞, 这种酶能催化无毒或低毒的前体药物代谢成细胞毒性产物, 杀伤靶细胞, 并通过“旁观者效应”杀伤周围细胞。目前研究最为深入的自杀基因是胞嘧啶脱氨酶基因(cytosine deaminase, CD)和单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因(herpes simplex virus type I thymidine kinase, HSV- I TK)。这两种自杀基因均已进入临床试验, 然而实际应用效果并不理想^[1-2], 提示自杀基因疗法有待进一步完善。将自杀基因与化疗药物或其他基因疗法联合以提高自杀基因的抗肿瘤效应, 是目前常用策略^[3-5]。肿瘤生长、浸润及转移均离不开瘤内新生血管形成, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在新生血管形成中发挥重要作用。研究表明, VEGF 不仅作为旁分泌因子刺激血管内皮细胞增殖、分化, 增加肿瘤新生血管生成, 提高微血管通透性^[6], 而且直接作用于肿瘤细胞, 促进肿瘤细胞生长^[7]。VEGF 在多数肿瘤组织中高表达, 与肿瘤的预后及复发密切相关^[8]。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是在 mRNA 水平上的基因阻断技术, 可高效、特异下调靶基因表达^[9]。人胃腺癌细胞系 SGC7901 细胞表达癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)及 VEGF, 是胃癌细胞系的主要亚型之一。我们前期研究已构建靶向表达融合自杀基因 yCDglyTK 的载体^[10-12], 为进一步增强该体系的抗肿瘤效应, 本研究采用融合自杀基因与靶向 VEGF 的 RNAi 联合, 构建重组质粒 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK, 研究其在人胃癌细胞系 SGC7901 细胞中的表达和杀伤作用, 为进一步研究该联合基因质粒的抗肿瘤效应奠定基础。

* 国家自然科学基金(30800518)和教育部博士点新教师基金(200805331090)资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 0731-84327282, Fax: 0731-84327332

张桂英. E-mail: guiyangzhang@hotmail.com

刘 霆. E-mail: liuting818@126.com

收稿日期: 2009-10-13, 接受日期: 2010-01-29

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、*Hind* III、*Bgl* II、*Xba* I 及 T4-DNA 连接酶(New England BioLabs); DL 2000(Takara 公司); r Taq DNA 聚合酶(Takara 公司); 胶回收试剂盒(宁波中鼎生物公司); 小牛血清(Hyclone 公司); RPMI-1640 (Hyclone 公司); 胰酶(Beyotime 公司); G418(Sigma 公司); 磷酸钙纳米颗粒(中南大学湘雅医院); 逆转录试剂盒(TOYOBO 公司); 2×Taq PCR MasterMix(TIANGEN 公司); 兔抗 CD 抗体(Promega 公司); 鼠抗人 VEGF 抗体(SANTA CRUZ 公司); 5- 氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC, Sigma 公司).

1.2 质粒和细胞

pGenesil-1 (武汉晶赛公司); pcDNA3.1 (+) (Invitrogen 公司); PMD19-T-Simple vector (Takara 公司); pcDNA3.1(-)Null(空白质粒)以及 pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK(中南大学湘雅医院构建); 人胃癌细胞株 SGC7901(湘雅医院中心实验室).

1.3 构建干扰质粒 pGenesil-VEGF-siRNA

基因库查找编码人 VEGF 的 mRNA 序列, 根据 RNAi 设计软件并参考有关文献^[13], 选择靶序列为 5' GGCCAGCACAUAGGAGAGA 3'. 人工合成一对互补并编码相应短发夹 RNA(short hairpin RNA, siRNA)的寡核苷酸链(上海生工公司合成), 寡核苷酸链末端引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 链的中部为形成茎环所需的 9 个碱基, 序列如下: 正义链, 5' GATCCGCGCCAGCACATAGGAGAG-ATTCAAGACGTCTCTCCTATGTGCTGGCCTTT-TTTGTCGACA 3'; 反义链, 5' GCCGGTCGTGT-ATCCTCTCTAAGTTCTGCAGAGAGGATACACG-ACCGGAAAAAACAGCTGTTCGA 3'. 经退火形成的双链被克隆至 pGenesil-1 的 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点之间, 由 U6 启动子驱动 siRNA 片段表达, 构成干扰质粒 pGenesil-VEGF-siRNA, 测序证实序列正确性.

1.4 将 VEGF-siRNA 表达框亚克隆至 pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK

1.4.1 采用 PCR 法从 pGenesil-VEGF-siRNA 中扩增 siRNA 表达框架(含 U6 启动子). 引物序列如下: P1, 5' GAAGATCTGTGACAAAAAAGGC-CAGC 3' (划线处引入 *Bgl* II 酶切位点), P2, 5' TTTTCTAGAGTCGACGAATTCC 3' (划线处

引入 *Xba* I 酶切位点), 由上海生工公司合成, 产物大小为 423 bp. PCR 反应体系: P1(10 μ mol/L) 1 μ l, P2(10 μ mol/L) 1 μ l, 双蒸水 39.5 μ l, 10× r PCR 缓冲液 (Mg^{2+}) 5 μ l, DNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ l, r Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l, 模板 1 μ l. 反应条件: 94℃ 预变性 5 min 后, 按下列参数循环 30 次: 94℃ 变性 20 s, 55℃ 退火 25 s, 72℃ 延伸 30 s, 最后再于 72℃ 延伸 3 min. 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 纯化回收 PCR 产物, 保存于 4℃.

1.4.2 以一段无关序列替换 pcDNA3.1 (-)CV-yCDglyTK 中的 yCDglyTK 基因. pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK 含 CMV 增强子和 CEA 启动子, 能靶向驱动融合自杀基因 yCDglyTK 在 CEA 阳性的细胞中靶向表达. 通过酶切位点分析, 发现 yCDglyTK 基因序列中含有 *Bgl* II 等酶切位点, 影响后续实验, 故先以一段无关序列(不含实验中用到的酶切位点)替换 pcDNA3.1 (-)CV-yCDglyTK 中的 yCDglyTK 基因. 用 *Xho* I 和 *Hind* III 将载体 pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK 和 pcDNA3.1(+)分别双酶切, 纯化回收目的条带(pcDNA3.1 (-)CV-yCDglyTK 载体和 pcDNA3.1(+)的无关序列), 并将二者连接, 反应体系: 10×T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ l, T4 DNA 连接酶 1 μ l, 载体 0.7 μ l, 无关序列 7.3 μ l, 4℃ 反应过夜. 连接产物命名为 pcDNA3.1-NO-CD/TK, 以 *Xho* I + *Hind* III 酶切鉴定.

1.4.3 siRNA 表达框架亚克隆至 pcDNA3.1-NO-CD/TK. 第一步的 PCR 产物与 pcDNA3.1-NO-CD/TK 分别行 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切, 回收 siRNA 表达框架以及 pcDNA3.1-NO-CD/TK 载体, 通过 T4 DNA 连接酶将二者连接, 命名为 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/NO-CD/TK. 用 *Bgl* II 和 *Xba* I 酶切鉴定.

1.4.4 将融合自杀基因序列移回 pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/NO-CD/TK. pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/NO-CD/TK 和 pcDNA3.1-CV-yCDglyTK 分别行 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切, 纯化回收 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/NO-CD/TK 载体和 yCDglyTK 片段, 并将二者连接, 得到 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK. 以 *Hind* III + *Xho* I 双酶切鉴定融合自杀基因, 并测序证实 siRNA 表达框架的正确性.

1.5 建立稳定转染的细胞系

人胃癌细胞株 SGC7901 培养在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 中, 胰酶消化制成单细胞悬液, 以 2×10^5 个 / 孔接种于 4 块 6 孔板, 每板接种

2 孔. 24 h 后, 细胞融合度达 70%~80%, 以磷酸钙纳米颗粒为载体分别与 pcDNA3.1(-)Null、pGenesil-VEGF-siRNA、pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK 以及 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK 结合, 转染 SGC7901 细胞, 每板留一孔不转染任何质粒为对照; 次日, 转染孔的 SGC7901 细胞以 1:10 或更高比例传代; 24 h 后, 以选择性完全培养基(根据前期 G418 最佳浓度确定实验设置 G418 浓度为 400 mg/L)培养, 挑取克隆并扩大培养(G418 200 mg/L 维持), 建立稳定转染的细胞系.

1.6 RT-PCR 和 Western-blot 检测目的基因的表达

RT-PCR: 收集未转染及转染上述 4 种质粒的 SGC7901 细胞, TRIzol 提取各组细胞的总 RNA, 分光光度计检测 A_{260} 以计算 RNA 的浓度, A_{260}/A_{280} 以了解 RNA 的质量. 按说明书进行逆转录反应. PCR 检测目的基因在各组细胞的表达. 所用引物如下: yCDglyTK 引物, P1, 5' GGGAGATTAGAGGGCAAAGTGT 3', P2, 5' ACGGCGTCGGTCA-CGGCATAA 3', 产物长度为 707 bp; VEGF 引物, P1, 5' TCTTCAAGCCATCCTGTGTG 3', P2, 5' ATCCGCATAATCTGCATGGT 3', 产物长度为 112 bp; 以 β -actin 为内参, P1, 5' AGCGAGCA-TCCCCCAAAGTT 3', P2, 5' GGGCACGAA-GGCTCATCATT 3', 产物为 285 bp. 反应体系: 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 12.5 μ l, P1(10 μ mol/L) 1 μ l, P2(10 μ mol/L) 1 μ l, 模板 1 μ l, 双蒸水 9.5 μ l. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C (yCDglyTK)或 53 $^{\circ}$ C (VEGF)退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 32 次; 最后再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳. 根据各条带的灰度值, 采用 BANDSCAN 软件分析 VEGFmRNA 的表达水平.

Western-blot: 收集对数期生长的各组细胞, 加入细胞裂解液冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清即为细胞总蛋白; BCA 法测定蛋白质浓度; 将 40 μ g 蛋白质与相应体积的 6 $\times$ 上样缓冲液混合, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min; 样品经 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至 PVDF 膜; 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入兔抗 CD 抗体(1:100)和鼠抗人 VEGF 抗体(1:200), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 洗去一抗后, 加入辣根过氧化物酶偶联的相应二抗(1:2000), 室温孵育 2 h, 化学发光法显色, 显影、定影, 扫描结果.

1.7 各组细胞对 5-FC 敏感性检测

取未转染及转染 4 种质粒的 SGC7901 细胞, 以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养; 设置未转染的 SGC7901 细胞为空白对照组, 次日更换新鲜完全培养基, 其余 4 组更换为含 200 mg/L 5-FC 的新鲜完全培养基(我们前期研究证实单独 5-FC 杀伤细胞的效应较 5-FC 和 GCV 同时存在时要强^[9], 200 mg/L 为多数文献采取的干预浓度), 继续培养 96 h 后, 加入 5 g/L MTT 孵育 4 h, 小心吸去上清, 加入 150 μ l/孔 DMSO, 室温避光振荡 10 min 使紫色结晶充分溶解, 酶标仪检测各孔对 570 nm 波长的光吸收值 (A_{570}), 实验重复 3 次, 每次设置 5 个平行孔. 以空白对照组的细胞存活率为 100%对照, 计算其余 4 组细胞的相对存活率(存活率=试验组 A_{570} /对照组 $A_{570} \times 100\%$).

1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据处理分析: 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 $P < 0.05$.

2 结 果

2.1 联合基因载体 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK 的表达框

联合基因载体 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK 表达框的构建见图 1.

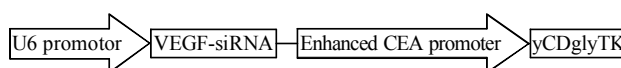


Fig. 1 The expression cassettes of pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK

2.2 联合基因载体 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK 的构建及鉴定

以 pGenesil-VEGF-siRNA 为模板, PCR 扩增 siRNA 表达框架. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2a 所示, 从图 2 中可见泳道 1 在约 423 bp 的位置有一条带, 与预计结果相符.

pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK 经 *Xho* I、*Hind* III 双酶切后得到的融合自杀基因长度为 1 654 bp, pcDNA3.1(+)双酶切后得到的无关序列长度为 543 bp. 将双酶切后 pcDNA3.1(-)CV-yCDglyTK 载体与无关序列连接, 得到 pcDNA3.1-NO-CD/TK,

Xho I 和 *Hind* III 酶切鉴定(图 2b)证实融合自杀基因序列已被无关序列替换。

将 VEGF-siRNA 表达框亚克隆至 pcDNA3.1-NO-CD/TK, 构建 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/NO-CD/TK, 用 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切鉴定(图 2c), 在 423 bp 的位置出现条带, 证明 siRNA 表达框架成功亚克隆至 pcDNA3.1-NO-CD/TK。

将 pcDNA3.1-CV-yCDglyTK 中的 yCDglyTK

移至 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/NO-CD/TK 得到新型联合基因质粒 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK。 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定融合自杀基因(图 2d), 酶切片段长度与理论结果一致 (1 654 bp)。测序结果与所设计的编码相应 siRNA 的寡核苷酸链序列完全一致, 证明新型联合基因质粒 pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK 构建成功。

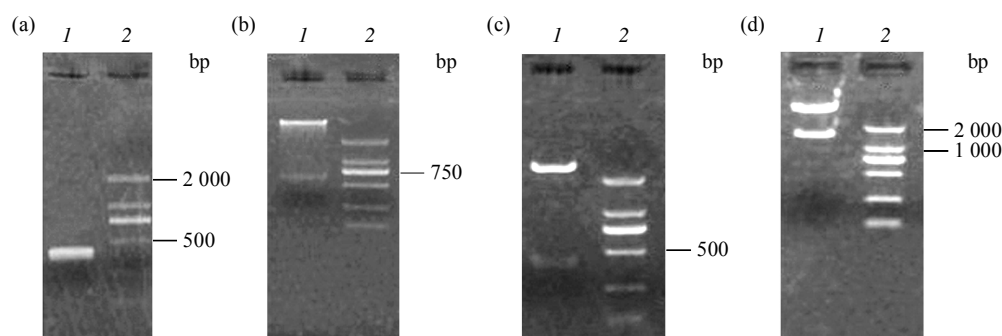


Fig. 2 Electrophoretogram of PCR and restriction enzyme digestion during construction of pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK

(a) 1: Amplification of VEGF-siRNA expression cassette from pGenesil-VEGF-siRNA by PCR; 2: DL2000 marker. (b) 1: Digested products of pcDNA3.1-NO-CD/TK by *Xho* I and *Hind* III; 2: DL2000 marker. (c) 1: Digestion of pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/NO-CD/TK by *Bgl* II and *Xba* I; 2: DL2000 marker. (d) 1: pcDNA3.1(-)VEGF-siRNA/yCDglyTK digested by *Xho* I and *Hind* III; 2: DL2000 marker.

2.3 建立稳定转染的细胞株

含 400 mg/L G418 的完全培养基筛选 7 天后, 对照组 SGC7901 细胞全部被杀死, 3 周左右, 转染组均可见抗性克隆形成(图 3)。挑取克隆, 以含 200 mg/L G418 的完全培养基维持筛选, 建立稳定转染的细胞系, 分别命名为 SGC7901/Null、SGC7901/VEGF-siRNA、SGC7901/yCDglyTK 及 SGC7901/VEGF-siRNA-yCDglyTK。

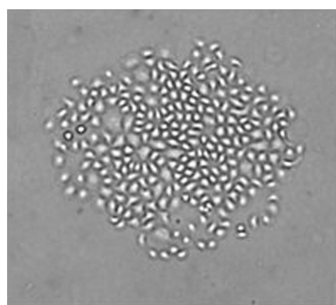


Fig. 3 Neomycin-resistant monoclonal clone of SGC7901 cell obtained by G418 selection (x200)

2.4 RT-PCR 和 Western-blot 检测目的基因的表达情况

RT-PCR 结果提示, 转染联合基因组及单独转

染双自杀基因组均可检测到融合自杀基因 yCDglyTK 的表达, 其他组无表达(图 4a); 转染联合基因组 VEGF mRNA 水平与转染干扰质粒组无明显差异 ($P > 0.05$), 但较普通胃癌细胞组、转染空质粒组以及转染双自杀基因组显著降低 ($P < 0.01$, 图 4a, 表 1)。Western-blot 结果与 RT-PCR 结果基本一致(图 4b, 表 1)。

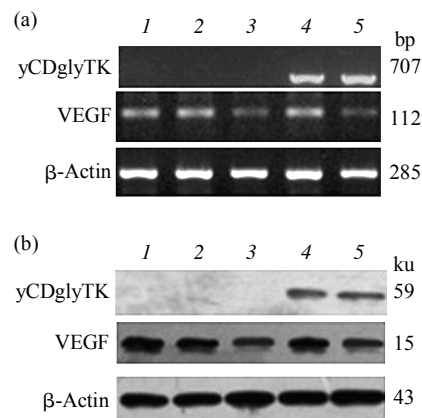


Fig. 4 Expression of yCDglyTK and VEGF detected by RT-PCR(a) and Western-blot(b)

1: SGC7901; 2: SGC7901/Null; 3: SGC7901/VEGF-siRNA; 4: SGC7901/yCDglyTK; 5: SGC7901/VEGF-siRNA-yCDglyTK.

Table 1 Expression level of VEGF in each group

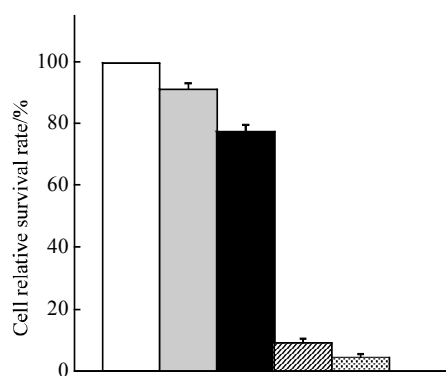
Group	VEGF mRNA	VEGF protein
SGC7901	0.527±0.010	0.494±0.032
SGC7901/Null	0.517±0.022	0.483±0.016
SGC7901/VEGF-siRNA	0.158±0.018*	0.213±0.022*
SGC7901/yCDglyTK	0.497±0.026	0.510±0.020
SGC7901/VEGF-siRNA-yCDglyTK	0.166±0.031*	0.218±0.020*

β -Actin was used as internal parameters; * $P < 0.01$, $n = 3$.

通过 RT-PCR 和 Western-blot 证实, 在新型联合基因质粒 pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/yCDglyTK 中, U6 启动子驱动针对 VEGF 的 siRNA 表达, 增强型 CEA 启动子驱动融合自杀基因 yCDglyTK 表达, 二者互不影响。

2.5 各组细胞对 5-FC 的敏感性

以空白对照组细胞存活率为 100% 对照, 经前体药物 5-FC 作用 96 h 后, 空白质粒组细胞相对存活率稍下降, 提示 5-FC 对细胞毒性有限; 干扰质粒组细胞相对存活率为 (77.408±3.920)%, 提示抑制 VEGF 表达可一定程度抑制细胞增殖; 双自杀基因组及联合基因组细胞对 5-FC 敏感, 细胞相对存活率显著低于空白对照组及实验对照组; 以联合基因组下降最明显, 与双自杀基因治疗组相比有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5)。

**Fig. 5** Cell relative survival rate of each group

□: SGC7901; ▨: SGC7901/Null; ■: SGC7901/VEGF-siRNA; ▨: SGC7901/yCDglyTK; ▨: SGC7901/VEGF-siRNA-yCDglyTK.

3 讨 论

基因治疗肿瘤已成为研究热点, 然而, 以往的单基因治疗效果并不理想, 主要原因可能在于肿瘤的发生、发展涉及多个基因的变化, 功能失常的基

因在时间和空间上互相配合, 促进肿瘤的进展. 因此, 向肿瘤细胞内导入多种相关基因, 通过多基因间相互协同以提高抗肿瘤效果是基因治疗的发展方向. 目前联合基因治疗主要面临两大问题: a. 寻找有效的基因组合; b. 联合基因载体中多基因的表达调控。

基因治疗中, 自杀基因以强大的杀伤肿瘤细胞效应及“旁观者效应”备受关注, 目前 CD 基因和 TK 基因已广泛应用于基础研究和临床试验. Rogulski 等^[14]认为 CD/5-FC 系统和 TK/GCV 系统作用环节不同, 联合应用可互相协同从而提高抗肿瘤效应; 此外, 由于不同类型肿瘤细胞对不同酶/前体药体系的敏感性存在差异, 如胃肠系肿瘤对 CD/5-FC 系统较为敏感, 而脑胶质瘤等则对 TK/GCV 系统敏感, 因此联合 CD 基因和 TK 基因可扩大肿瘤治疗谱^[15]. Hamstra 等^[16]发现源于酵母的 CD 基因(yCD)较大肠杆菌 CD 基因(bCD)可更有效地催化 5-FC 变成 5-FU. 我们前期构建了含酵母 CD 基因的融合自杀基因 yCDglyTK, 利用增强型 CEA 启动子驱动其在 CEA 阳性细胞中靶向表达, 并证明在前体药物 5-FC 作用下, 该融合自杀基因可靶向、高效杀伤瘤细胞^[10]. VEGF 在胃癌中高表达, 与肿瘤预后密切相关^[17]. RNA 干扰通过导入或表达与靶基因序列同源的小干扰 RNA(siRNA)诱导相应的 mRNA 降解, 导致转录后基因沉默. 既往研究证实, 利用 RNAi 可有效下调 VEGF 在鼻咽癌^[18]、结肠癌^[13]等多种肿瘤细胞中表达, 降低微血管密度, 抑制肿瘤生长. 为此, 本研究选择以 VEGF 为靶点的 RNAi 与融合自杀基因体系相联合, 既可减少肿瘤内新生血管的形成, 抑制肿瘤生长及转移, 又可靶向杀伤肿瘤细胞。

关于多基因表达的调控问题, 目前主要通过 3 种途径实现^[19]: a. 双启动子驱动双基因表达; b. 引入内部核糖体进入位点; c. 将需要表达的 2 个基因组成融合基因. 为实现 RNAi 与双自杀基因相联合, 我们首先构建靶向 VEGF 基因的干扰质粒 pGenesil-VEGF-siRNA, 随后将包括 U6 启动子在内的 siRNA 表达框亚克隆至 pcDNA3.1 (-)CV-yCDglyTK 中, 构建新型联合基因质粒 pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/yCDglyTK. 该联合基因载体利用两种途径实现 3 种不同基因的表达: U6 启动子驱动 VEGF-siRNA 表达、增强型 CEA 启动子调控融合自杀基因 yCDglyTK 靶向表达。

为验证联合基因载体 pcDNA3.1 (-)VEGF-

siRNA/yCDglyTK 的表达, 以低毒、生物相容性好的磷酸钙纳米颗粒为载体^[20]介导单基因及联合基因治疗质粒转染 CEA 阳性的 SGC7901 细胞, G418 筛选, 建立稳定转染的细胞株. RT-PCR 和 Western-blot 验证, 转染联合基因质粒的 SGC7901 细胞表达 yCDglyTK, 且 VEGF 表达明显下调, 证实在 pcDNA3.1(-)-VEGF-siRNA/yCDglyTK 中, U6 启动子驱动 siRNA 表达、增强型 CEA 启动子驱动融合自杀基因 yCDglyTK 表达, 二者互不影响. 5-FC 敏感性试验显示, 与空白对照组相比, 空白质粒组细胞相对存活率稍下降, 提示前体药物 5-FC 对普通胃癌细胞毒性有限; 联合基因组细胞存活率显著下降, 与干扰质粒组及双自杀基因组相比有统计学意义, 初步证实靶向 VEGF 的 RNA 干扰与双自杀基因系统具有协同效应.

本研究构建了新型联合基因质粒 pcDNA3.1(-)-VEGF-siRNA/yCDglyTK, 证实其在人胃癌细胞系 SGC7901 细胞中的表达和杀伤作用, 为进一步体内外实验奠定基础.

参 考 文 献

- [1] Shand N, Weber F, Mariani L, *et al.* A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**(14): 2325-2335
- [2] Rainov N G. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther*, 2000, **11**(17): 2389-2401
- [3] Moriuchi S, Glorioso J C, Maruno M, *et al.* Combination gene therapy for glioblastoma involving herpes simplex virus vector-mediated codelivery of mutant Ikappa B alpha and HSV thymidine kinase. *Cancer Gene Ther*, 2005, **12**(5): 487-496
- [4] Kagaya T, Nakamoto Y, Sakai Y, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 gene delivery enhances antitumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in a model of colon cancer. *Cancer Gene Ther*, 2006, **13**(4): 357-366
- [5] Seung-Yoon P, Wan L, Jaetae L, *et al.* Combination gene therapy using multidrug resistance (MDR1) gene siRNA and herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Lett*, 2008, **261**(2): 205-214
- [6] Byrne A M, Bouchier-Hayes D J, Harmey J H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*, 2005, **9**(4): 777-794
- [7] Jackson M W, Roberts J S, Heckford S E, *et al.* A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res*, 2002, **62**(3): 854-859
- [8] Balsari A, Maier J A, Colnaghi M I. Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. *Laboratory Investigation*, 1999, **79**(7): 897-902
- [9] Hannon G J. RNA Interference. *Nature*, 2002, **418**(6894): 244-251
- [10] 刘 霆, 张桂英, 陈玉祥, 等. 癌胚抗原启动子调控融合自杀基因 yCDglyTK 载体的构建及其应用研究. *中国医学工程*, 2006, **14**(2): 120-124
- [11] Liu T, Zhang G Y, Chen Y X, *et al.* Chin Med Engineer, 2006, **14**(2): 120-124
- [12] Liu T, Zhang G Y, Chen Y H, *et al.* Tissue specific expression of suicide genes delivered by nanoparticles inhibits gastric carcinoma growth. *Cancer Biology & Therapy*, 2006, **5**(12): 3379-3387
- [13] Zhang G Y, Liu T, Chen Y X, *et al.* Tissue specific cytotoxicity of colon cancer cells mediated by nanoparticle-delivered suicide gene *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Therapy: Preclinical*, 2009, **15**(1): 201-207
- [14] Wang S C, Liu H, Ren L F, *et al.* Inhibiting colorectal carcinoma growth and metastasis by blocking the expression of VEGF using RNA interference. *Neoplasia*, 2008, **10**(4): 399-407
- [15] Rogulski K R, Kim J H, Kim S H, *et al.* Glioma cells transduced with an *Escherichia coli* CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**(1): 73-85
- [16] Pastorakova A, Hlubinova K, Altaner C. Treatment of human tumor cells by combine gene therapy harnessing plasmids expressing human tumor necrosis factor alpha and bacterial cytosine deaminase suicide gene. *Neoplasia*, 2007, **53**(6): 478-484
- [17] Hamstra D A, Rice D J, Fahmy S, *et al.* Enzyme/prodrug therapy for head and neck cancer using a catalytically superior cytosine deaminase. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**(12): 1993-2003
- [18] 王天宝, 曲延刚, 高 鹏, 等. P15, 血管内皮生长因子在胃癌中的表达及意义. *中国普通外科杂志*, 2000, **9**(4): 311-314
- [19] Wang T B, Qu Y G, Gao P, *et al.* *Chin J General Surgery*, 2000, **9**(4): 311-314
- [20] 周海波, 伍 钢, 彭 纲, 等. siRNA 抑制 VEGF 基因表达对鼻咽癌细胞生物学行为的影响. *临床肿瘤学杂志*, 2008, **13**(6): 485-490
- [21] Zhou H B, Wu G, Peng G, *et al.* *Chin Clin Oncol*, 2008, **13**(6): 485-490
- [22] Ray P, Bauer E, Iyer M, *et al.* Monitoring gene therapy with reporter gene imaging. *Semin Nucl Med*, 2001, **31**(4): 312-320
- [23] Liu T, Tang A F, Zhang G Y, *et al.* Calcium phosphate nanoparticles as a novel nonviral vector for efficient transfection of DNA in cancer gene therapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2005, **20**(2): 138-147

Construction of Combination Gene Vector Expressing VEGF-siRNA and Fusion Suicide Gene yCDglyTK and Its Application*

YE Ling¹⁾, ZHANG Gui-Ying^{1)**}, LIU Ting^{1)**}, CHEN Xuan-Min¹⁾, YI Hong²⁾,
XIAO Zhi-Qiang²⁾, LENG Ai-Min¹⁾, PENG Jie¹⁾

(¹⁾ Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾ Key Laboratory of Cancer Proteomics of Ministry of Health of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract This research aimed to construct a new combination gene vector: pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/yCDglyTK, study its expression quality and lethal effect in human gastric cancer cell line SGC7901. First, RNA interference (RNAi) targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) was applied to construct interfering plasmid pGenesil-VEGF-siRNA. Then, the siRNA expression cassette (including U6 promotor) was amplified by PCR and subcloned into pcDNA3.1 (-)CV-yCDglyTK to build a new combination gene plasmid: pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/yCDglyTK. The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme digestion and gene sequencing. All of the three plasmids were delivered into SGC7901 cells using calcium phosphate nanoparticles (CPNPs). Expressions of yCDglyTK and VEGF were detected by RT-PCR and Western-blot. MTT assays were applied to determine the cytotoxic effect of plasmids in the presence of 5-FC. Restriction enzyme digestion and gene sequencing confirmed the combination gene vector pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/yCDglyTK was constructed successfully. RT-PCR, Western-blot showed expression of yCDglyTK and inhibition of VEGF in SGC7901 cells transfected with the combined gene plasmid, which were the most sensitive to 5-FC in the MTT assays. The combination gene vector pcDNA3.1 (-)VEGF-siRNA/yCDglyTK was constructed successfully. It was tentatively confirmed that RNAi targeting VEGF could synergize with suicide gene therapy.

Key words RNA interference, suicide gene, gastric cancer, combination gene therapy

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00598

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30800518) and The Ph.D. Programs Foundation Ministry of Education of China (200805331090)

**Corresponding author. Tel: 86-731-84327282, Fax: 86-731-84327332

ZHANG Gui-Ying. E-mail: guiyangzhang@hotmail.com

LIU Ting. E-mail: liuting818@126.com

Received: October 13, 2009 Accepted: January 29, 2010