

• 实验研究 •

## VEGF-C 短发夹 RNA 抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭能力的实验研究

古立诚 肖焕擎 徐波 朱光辉 李书华

**【摘要】 目的** 探讨应用靶向 VEGF-C 的短发夹 RNA (shRNA) 质粒载体在体外抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 生物学活性的影响。**方法** 制备携带有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的 VEGF-C-shRNA 质粒载体,脂质体转染方法转入乳腺癌细胞株 MCF-7,通过倒置荧光显微镜及流式细胞术检测细胞的转染效率,RT-PCR 及 Western blot 检测转染细胞内 VEGF-C mRNA 及蛋白的表达变化,MTT 法检测细胞增殖抑制率,重组基底膜侵袭实验检测细胞侵袭能力。**结果** 高效转染入 VEGF-C-shRNA 的 MCF-7 细胞 VEGF-C mRNA 及蛋白表达水平显著下降;VEGF-C ShRNA 对 MCF-7 细胞具有明显的增殖抑制作用,其抑增殖效应呈时间依赖性;VEGF-C-shRNA 可抑制乳腺癌细胞 MCF-7 体外侵袭重组基底膜的能力,与阴性 shRNA 转染组、空载体组及空白组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** VEGF-C 在乳腺癌增殖、侵袭转移中发挥重要作用,通过 RNA 干扰技术实现 VEGF-C 沉默在乳腺癌的基因治疗中具有可行性。

**【关键词】** 血管内皮生长因子-C; 乳腺癌; 短发夹 RNA; RT-PCR; Western blot

**【中图法分类号】** R737.9 **【文献标识码】** A

---

基金项目:广东省社会发展领域科技计划项目(2006B35530001)

作者单位:510620 广州,广州市第十二人民医院普外科(古立诚);510120 广州,广州医学院附属广州市第一人民医院普外科(肖焕擎、徐波、朱光辉);510182 广州,广州医学院病理教研室(李书华)

通讯作者:肖焕擎,E-mail:aabb97@163.com

## Down-regulation of VEGF-C using short hairpin RNA inhibits proliferation and invasion of human breast cancer cells

GU Li-cheng, XIAO Huan-Qing, XU-Bo, ZHU Guang-hui, LI Shu-hua. Department of General Surgery, Guangzhou Municipal Twelfth People's Hospital, Guangzhou 510620, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the anti-tumor effect of short hairpin RNA (shRNA)-mediated inhibition of VEGF-C (vascular endothelial growth factor C) on human breast cancer *in vitro*. **Methods** Breast cancer cell line MCF-7 was stably transfected with a VEGF-C short hairpin RNA (shRNA) plasmid vector labeled with green fluorescent protein. The transfected cells were visualized by fluorescent microscope and assayed by flow cytometry. The expression of VEGF-C in transfected cells was determined by RT-PCR and Western blot. The cell growth inhibition rate and the invasive capacity were evaluated by MTT method and reconstituted basement membrane invasion assay. **Results** VEGF-C shRNA specifically and effectively downregulated VEGF-C mRNA and protein expression *in vitro*. And it also effectively inhibited proliferation and invasive capacity of MCF-7 cells when compared to vehicle, vector and control shRNA. **Conclusions** These data in our study demonstrated that VEGF-C plays an important role in tumor growth, invasive capacity of breast cancer. RNA interference targeting VEGF-C may serve as a potential therapeutic intervention for human breast cancer.

**【Key words】** Vascular endothelial growth factor-C ; Breast carcinoma;  
Short hairpin RNA; RT-PCR; Western blot

肿瘤血行转移主要通过肿瘤性血管形成和淋巴循环系统两种途径介导。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族是调节肿瘤血管新生形成最主要的一组因子<sup>[1]</sup>,其成员之一 VEGF-C 可分别结合血管内皮细胞受体 2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)及淋巴管内皮细胞表面受体 VEGFR-3,调节血管及淋巴管的生理功能。本研究构建携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)报告基因的 VEGF-C-短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)质粒载体,通过体外实验观察其对乳腺癌细胞生长的抑制效应,探讨 VEGF -C 在乳腺癌细胞生长中的作用,以及 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术应用于乳腺癌基因治疗的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自上海细胞研究所;携带 GFP 的真核表达质粒

pRNAT-H1.1/Neo 购自美国 Genscript 公司;脂质体转染试剂 TransFast (tm) Transfection reagent、反转录试剂盒和 MTT 购自 Promage 公司; Transwell 小室购自 Costar 公司, PVDF 膜购自 Sigma 公司, 抗 VEGF-C 多克隆抗体、抗 VEGFR-3 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗购自美国 Sigma 公司, ECL Western Blot 试剂盒购自瑞典 Amersham Pharmacia 公司。

## 1.2 携带 GFP VEGF-C-shRNA 质粒载体的构建

**1.2.1 靶向 VEGF-C 基因寡核苷酸的设计:**根据小干扰 RNA (small RNA interference, siRNA) 的设计原则并通过德国 GmbH 公司设计的 Cenix Bioscience 软件分析筛选出有效的 RNAi 作用靶点,另设计一条阴性对照的寡核苷酸。序列如下:

VEGF-C-siRNA:5'-TCGATTACAGTCCCTCTCTCACAAGGAGTACTGCTTGTGAGAGAGGCACTGTAATTTTTT-3',3'-CTAGAAAAATTACAGTGCCTCTCTCACAAGCGTACTCCTTGTGAGAGAGGCACTGTAA-5';对照 siRNA:5'-TCGATCAGTCACTT AATGGTCGTTTTCAAGAGAAACGACCATTAACTGACTGATTTTT-3',3'-AGTCAGTGAATTACCAGCAAAAAGTTCTCTTTGCTGGTAATTGCACTGACTAAAAAGATC-5'。

**1.2.2 构建 VEGF-C-shRNA 表达载体:**将编码 shRNA 的两条寡核苷酸进行退火,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶双酶切后插入到载体相应的酶切位点处,  $T_4$  连接酶连接,再转化至感受态大肠杆菌中,质粒抽提经酶切电泳及测序验证。

## 1.3 细胞转染

取指数增殖期的 MCF-7 细胞(细胞数为  $2 \times 10^6$ /ml),待细胞达到 70% 融合时,按照试剂盒说明将 VEGF-C-shRNA 质粒载体转染入细胞内,同时设立空白组、空载体组和阴性对照 shRNA 载体组。转染 12、24、48、72 h 后用倒置显微镜观察细胞内 GFP 表达,并用流式细胞仪检测转染效率。

## 1.4 RT-PCR 检测转染 MCF-7 细胞中 VEGF-C-mRNA 表达

取转染 72 h 后的 MCF-7 细胞  $1 \times 10^6$ , Trizol 试剂抽提细胞总 RNA, RT 反应把细胞总 RNA 逆转录成 cDNA,以看家基因  $\beta$ -actin 为内参照,同一体系中同时加入 VEGF-C 基因和  $\beta$ -actin 基因引物,反应体系为  $H_2O$  17.1  $\mu$ l, dNTP 5  $\mu$ l, 基因引物 F/R 0.5/0.5  $\mu$ l, 缓冲液 1.0  $\mu$ l,  $MgCl_2$  1.75  $\mu$ l, Taq 酶 0.15  $\mu$ l, 模板 2.0  $\mu$ l, 总计 28  $\mu$ l。反应条件为 94  $^{\circ}C$  1 min, 94  $^{\circ}C$  45 s, 55  $^{\circ}C$  45 s, 72  $^{\circ}C$  45 s 共 35 个循环, 72  $^{\circ}C$  10 min。VEGF-C 基因和  $\beta$ -actin 基因引物由上海博亚公司合成,序列如下: VEGF-C forward primer 5'-CTACAGATGTGGGGGTTGCT-

3', VEGF-C reward primer 5'-GCTGCCTGACACTGTGGTAA-3';  $\beta$ -actin forward primer 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3',  $\beta$ -actin reward primer 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'。

### 1.5 Western blot 检测转染 MCF-7 细胞中 VEGF-C 蛋白表达

转染 72 h 后收集细胞,经 2% SDS 细胞裂解液裂解、超声、蛋白定量后,取 30  $\mu$ g 蛋白质于 PAGE-SDS 电泳分离后,电转印于 PVDF 膜上,Blotto A (1  $\times$  TBS, 5% 牛奶, 0.05% Tween-20) 封闭,一抗为 1:1000 稀释兔抗人 anti-VEGF-C 多克隆抗体,二抗为 HRP 标记的羊抗兔多克隆抗体,经孵育洗膜后 ECL 法显影,底片置于 Vilber Lourmat 图像分析仪中进行处理、摄片记录。

### 1.6 MTT 法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF-7,以每孔  $10^5$  个细胞接种于 96 孔板,培养 24 h,换成无血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞静止于  $G_0/G_1$  期,shRNA 转染终浓度为 0.1  $\mu$ mol/L,培养 72 h 后,再加入 5 mg/ml 的四唑盐液 10  $\mu$ l,继续培养 4 h,弃上清液,用 100  $\mu$ l 二甲基亚砷(DMSO)溶解结晶,于酶标仪上 570 nm 比色测吸光度值。

细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组 A 值/阴性对照组 A 值)  $\times$  100%。

### 1.7 体外侵袭试验

在 Transwell 上下室之间铺直径 13 mm 聚碳酸酯微孔滤膜,膜上均匀铺重组基底膜胶 50  $\mu$ g/孔,将小室置于 37  $^{\circ}$ C 温箱中聚合 30 min。以终浓度为 0.1  $\mu$ mol/L 的 VEGF-C-shRNA 处理细胞 24 h,取对数生长期细胞消化收集后计数,将细胞数调整至  $2 \times 10^4$  个,接种于上室中;下室加入 900  $\mu$ l 含或不含 VEGFR-3 (20 ng/ml) 的培养基,37  $^{\circ}$ C, 5%  $CO_2$  条件下放置 96 h。弃上室液体,擦净膜上未侵袭的细胞及重组基底膜胶,甲醇固定 30 min,常规 HE 染色,400 倍光学显微镜下选择滤膜上下左右中 5 个不同视野,计数每个视野侵袭细胞数,计算平均值,每组平行设 3 个滤膜。

侵袭抑制率 = (阴性对照组侵袭细胞数 - 实验组侵袭细胞数)/阴性对照组侵袭细胞数  $\times$  100%。

### 1.8 统计学处理

用 SPSS13.0 进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用  $\chi^2$  检验或方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

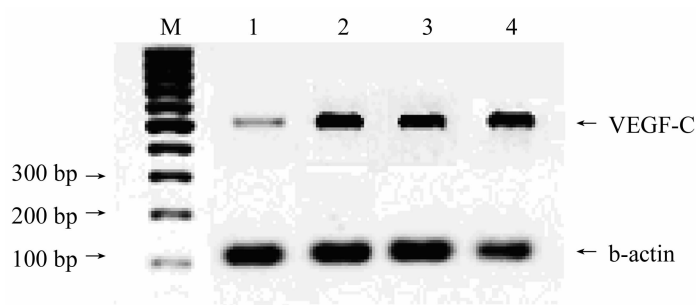
## 2 结果

### 2.1 VEGF-C shRNA 在 MCF-7 细胞中的转染效率

转染 12 h 后在倒置荧光显微镜下观察 MCF-7 细胞内出现绿色荧光,随着时间延长,绿色荧光增多增强,转染后 48 h 荧光强度达峰值,经 FCM 检测,空载体组、阴性对照 shRNA 组和 VEGF-C shRNA 阳性细胞百分比分别为 85.7%、78.8% 和 82.4%,转染组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.2 转染 MCF-7 细胞中 VEGF-C 基因 mRNA 表达量的变化

转染 72 h 后 RT-PCR 结果显示,VEGF-C 基因的 mRNA 表达量均较阴性对照组、空载体组及空白组低(图 1)。

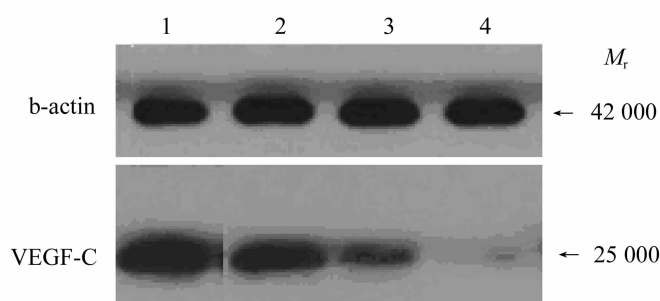


M:标记条带;1:VEGF-C-shRNA 转染组;2:阴性 shRNA 组;  
3:空载体组;4:空白组

图 1 转染 MCF-7 细胞中 VEGF-C 基因的表达变化

### 2.3 转染 MCF-7 细胞中 VEGF-C 蛋白表达量的变化

转染 72 h 后 Western blot 结果显示,VEGF-C shRNA 转染组中几乎检测不到 VEGF-C 蛋白表达(图 2)。



1:VEGF-C-shRNA 转染组;2:阴性 shRNA 组;  
3:空载体组;4:空白组

图 2 转染 MCF-7 细胞中 VEGF-C 蛋白表达的变化

## 2.4 瞬时转染 VEGF-C-shRNA 对 MCF-7 细胞增殖的影响

VEGF-C-shRNA 质粒转染后 24、48、72 h, MCF-7 细胞生长的抑制率分别为 18.72%、25.24%、42.48%, 表明 VEGF-C-shRNA 可有效抑制 MCF-7 细胞增殖, 并呈作用时间依赖性, 与空白组、空载体组、阴性对照 shRNA 组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 空载体组和阴性对照 shRNA 组对 MCF-7 细胞无明显增殖抑制作用(表 1)。

表 1 转染 shRNA 后不同时点 MCF-7 细胞的增殖抑制率 (%)

分组	24 h	48 h	72 h
VEGF-C-shRNA 组	18.72 ± 1.34 <sup>a</sup>	25.24 ± 2.36 <sup>a</sup>	42.48 ± 3.32 <sup>a</sup>
阴性 shRNA 组	6.26 ± 0.16	6.42 ± 0.29	6.79 ± 0.21
空载体组	5.24 ± 0.32	5.39 ± 0.43	5.72 ± 0.16
空白组	5.37 ± 0.43	5.43 ± 0.18	5.65 ± 0.25

a:  $P < 0.05$ , 与阴性 shRNA、空载体组、空白组比较

## 2.5 VEGF-C-shRNA 对人乳腺癌细胞体外侵袭能力的影响

VEGF-C-shRNA 可抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的体外侵袭重组基底膜能力, 与阴性对照 shRNA 组、空载体组、空白组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 转染 shRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭重组基底膜能力的影响

分组	侵袭细胞数	抑制率/(%)
VEGF-C-shRNA 组 <sup>a</sup>	56 ± 3.2	42.9
阴性 shRNA 组	97 ± 3.2	—
空载体组	98 ± 7.4	—
空白组	98 ± 2.0	—

a:  $P < 0.05$ , 与阴性 shRNA 组、空载体组、空白组比较

## 3 讨论

新生的血管/淋巴管在恶性肿瘤进展和浸润转移过程中发挥着重要作用。VEGF 家族及它们的受体是已知最重要的一组促血管/淋巴管新生的蛋白分子。近年的研究表明血管内皮生长因子受体(VEGFR)也表达于多种肿瘤细胞上, 肿瘤细胞分泌的 VEGF 通过自分泌机制与肿瘤细胞上的 VEGFR 结合, 调控下游基因的表达而促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移<sup>[2-4]</sup>。因此, VEGF 在促进肿瘤组织内皮细胞增殖、新生血管的同时, 还通过自分泌机制改变肿瘤细胞自身的凋亡、增殖以及侵袭转移能力来促进肿瘤的发展。利用药物抑制 VEGF 的产生或封闭其受体已成为治疗肿瘤的新思路。乳腺癌占女性恶性肿

瘤发病率的首位,由于乳腺富含淋巴管网,因此在肿瘤发生早期即可经淋巴道扩散,是否有淋巴转移已成为乳腺癌患者主要的预后因素。在对影响淋巴结转移的相关因素的研究中发现,VEGF-C 及其淋巴管内皮细胞受体 VEGFR-3 是目前为止发现的唯一一组调节胚胎组织淋巴管生成和成熟个体淋巴管生理功能的因子<sup>[5]</sup>。Plate<sup>[6]</sup>证实原位移植到裸鼠的人乳腺癌中存在淋巴管生成,乳腺癌细胞中 VEGF-C 的过表达能提高肿瘤内淋巴管生成,导致局部淋巴结及肺转移率明显增加,淋巴管生成的程度与淋巴结及肺转移程度显著相关。临床研究也显示 VEGF-C 在乳腺癌,尤其是浸润性导管癌组织中呈高表达<sup>[7]</sup>,且与区域淋巴结转移显著相关。Tsurusaki 等<sup>[8-9]</sup>在前列腺癌和肺癌组织中也发现 VEGF-C 高表达的癌组织淋巴管密度明显增高,因此推测 VEGF-C 可通过增加淋巴管的数目和大小以及通过改变新形成的淋巴管内皮细胞的功能特性而有利于肿瘤细胞向淋巴管内渗透、转移。RNAi 是通过 siRNA 介导的转录后基因沉默机制,可以有效并特异地抑制靶基因的表达。siRNA 的作用机制为与靶基因 mRNA 互补结合,从而降解序列特异性的 mRNA<sup>[10]</sup>。本研究构建的稳定转染 VEGF-C-shRNA 质粒载体,其原理是首先根据 siRNA 序列设计并合成一对互补的双链 DNA(dsDNA),并将其连接到质粒中,然后将含 dsDNA 的质粒转染到细胞中。在细胞内,外源性 dsRNA 作为模板,转录出单链 siRNA,后者折叠成发卡状结构(loop 环),因此被称为 shRNA,而含 dsDNA 的载体亦可称为 shRNA 表达载体。shRNA 上的 loop 环可被酶切,使原发卡状结构成为一双链 siRNA,从而对 DNA 发挥特异性干扰效应。

本研究通过倒置荧光显微镜及 FCM 检测 GFP 蛋白表达率以评价 MCF-7 细胞中 VEGF-C-shRNA 的转染效率,结果显示获得高阳性率的转染细胞,表明构建的 VEGF-C-shRNA 质粒载体可高效稳定转染至 MCF-7 细胞中;RT-PCR 及 Western blot 结果显示转染细胞中 VEGF-C-mRNA 及蛋白水平下降,表明筛选出的 VEGF-C-shRNA 可有效抑制 VEGF-C 的表达。MTT 法及肿瘤细胞重组基底膜侵袭实验结果表明,VEGF-C-shRNA 能够抑制 MCF-7 细胞增殖及对体外重组基底膜的侵袭能力,提示 VEGF-C 参与了乳腺癌细胞增殖及转移的相关生物学行为的调控,VEGF-C-shRNA 通过转录后基因沉默机制,抑制了 VEGF-C 对乳腺癌细胞的刺激增殖及侵袭作用。上述结果表明:本研究构建的 VEGF-C-shRNA 在乳腺癌细胞中可高效稳定表达;并通过抑制 VEGF-C 表达而抑制其生物学功能,抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭能力。RNAi 具有特异、高效、持久的特点,对目的基因的阻断过程比基因剔除更为简便,因此利用

RNAi 技术在肿瘤基因治疗方面具有可行性。

### 参考文献

- [1] Akihiko T, Oliver S, Syed A, *et al.* Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *Ann Surg Oncol*, 2002, 9: 610-616.
- [2] Tian X, Song S, Wu J, *et al.* Vascular endothelial growth factor; acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286: 505-512.
- [3] Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, *et al.* Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology*, 2002, 62: 157-166.
- [4] Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, *et al.* Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor(VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 2001, 93: 662-666.
- [5] Kaipainen A, Korhonen J, Taipale J, *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 3566-3570.
- [6] Plate K. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nat Med*, 2001, 7: 151-152.
- [7] Lee A H, Dublin E A, Bobrow L G, *et al.* Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J Pathol*, 1998, 185: 394-401.
- [8] Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, *et al.* Vascular endothelial growth factor C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer*, 1999, 80: 309-313.
- [9] Niki T, Iba S, Tokumou M, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 2431-2439.
- [10] Kunath T, Gish G, Lickert H, *et al.* Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 559-561.

(收稿日期: 2007-11-01)

(本文编辑: 陈莉)

古立诚, 肖焕擎, 徐波, 等. VEGF-C 短发夹 RNA 抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭能力的实验研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(1): 55-62.