· 实验研究 ·

RGD-TAT-KDRsiRNA 慢病毒载体构建及抗肿瘤活性*

张俭丽[1], 郑旭[2], 王杰[3]

摘　要: 目的　构建精氨酰 - 甘氨酰 - 天冬氨酸(RGD)介导的穿膜肽(TAT) - 血管内皮细胞生长因子受体(KDR) siRNA 融合基因慢病毒载体,探讨其对人肺癌 A549 细胞的抑制效果。**方法**　设计合成编码 RGD 的 2 条寡核苷酸链,克隆到 pGC/TAT - KDR siRNA 载体的 TAT 下游,构建 TAT-RGD-KDR siRNA 融合基因载体;慢病毒包装并感染 A549 细胞;通过 Western blot 和 real-time PCR 检测 A549 细胞 KDR 基因表达水平;通过噻唑蓝法、双色法流式细胞仪和 Transwell 侵袭实验检测 KDR 基因沉默对 A549 细胞凋亡和侵袭力的影响。**结果**　测序和 Blast 比对证实重组载体中的 RGD 序列与设计一致;TAT-RGD-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体转染 A540 细胞 KDR mRNA 和蛋白表达水平分别为(22.7 ± 3.9)% 和(19.3 ± 2.7)%,明显低于 TAT-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体转染组,差异有统计学意义($P < 0.01$);该载体具有较强的抑制 A549 细胞增殖、促进细胞凋亡和抑制细胞体外侵袭力的作用。**结论**　TAT-RGD-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体通过抑制细胞 KDR mRNA 和蛋白表达,抑制 A549 细胞增殖和侵袭、促进细胞凋亡。

关键词: 精氨酰 - 甘氨酰 - 天冬氨酸(RGD); 穿膜肽(TAT); 血管内皮细胞生长因子受体(KDR); TAT - RGD - KDR siRNA 融合基因; 慢病毒载体

中图分类号: R 373.9　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)05-0594-04　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-05-15

Lentiviral vector construction of RGD- TAT-KDR siRNA fusion gene and assessment of its antitumor activity

ZHANG Jian-li*, ZHENG Xu, WANG Jie (*Department of Basic Nursing, Affiliated Health School, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning Province* 110034, China)

Abstract: Objective　To construct a lentiviral vector of transcriptional activator protein-kinase insert domain receptor(TAT-KDR) siRNA fusion gene mediated by arginyle-glycyl-d-aspartic acid(RGD) and to assess its effects on human lung cancer A549 cells. **Methods**　Two oligonucleotide chains of coding RGD were synthetized and then cloned into downstream of thrombin-antithrombin III complex(TAT) in pGC/TAT-KDR siRNA vector to construct TAT-RGD-KDR siRNA fusion gene vector. Lentivirus was packaged and used to infect A549 cells. The expression level of KDR gene in A549 cells was detected with Western blot and real-time PCR. The proliferation, apoptosis and invasion ability of A549 cells were measured with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide(MTT) method, dual color flow cytometry, and transwell invasion assay. **Results**　Sequencing and Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) alignment confirmed that the RGD sequence was consistent with the design of the recombinant vector and the vector could reduce expression level of KDR mRNA and protein in A549 cells and inhibit the proliferation and invasiveness and promote apoptosis of A549 cells *in vitro*. **Conclusion**　The lentiviral vector of TAT-RGD-KDR siRNA fusion gene can inhibit the proliferation and invasion and promote the apoptosis of A549 cell line by inhibiting the expression level of KDR mRNA and protein.

Key words: arginyl-glycyl-d-aspartic acid(RGD); transcriptional activator protein(TAT); kinase insert domain receptor(KDR); TAT-RGD-KDR siRNA fusion gene; lentiviral vector

研究表明,穿膜肽(transcriptional activator protein, TAT)介导的靶向血管内皮细胞生长因子受体(kinase insert domain receptor, KDR)的 siRNA 慢病毒载体能有效抑制小细胞型肺癌 A549 细胞的生长和转移,具有细胞感染率高、穿膜作用强等优点,但肿瘤靶向作用有待进一步提高[1]。精氨酰 - 甘氨酰 - 天冬氨酸(RGD)是整合素 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ 特异性配体,由精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸的短肽构成,目前已被公认为是肿瘤靶向分子。研究发现,RGD 可以高效地结合到肿瘤细胞表面高表达的整合素分子,具有较强的肿瘤细胞选择性和阻断整合素的作用,是肿瘤靶向药物输送,控制肿瘤生长、转移的最有效途径[2]。本研究在 TAT 介导的靶向 KDR 的 siRNA 慢病毒载体基础上,利用基因重组技术,将 RGD 序列插入到 TAT 下游,将 TAT 的穿膜作用和 RGD 的肿瘤靶向作用有机结合,构建 TAT-RGD-

* **基金项目**: 辽宁省自然科学基金(201102214); 沈阳市科技局科技计划项目(F11-264-1-29)
作者单位: 1. 沈阳医学院附属卫生学校基础护理教研室,辽宁 沈阳 110034; 2. 沈阳市和平区疾病预防控制中心; 3. 沈阳医学院继续教育学院
作者简介: 张俭丽(1964),女,辽宁兴城人,高级讲师,本科,研究方向:抗肿瘤治疗。
通讯作者: 王杰,E-mail: wangjie19932002@163.com。
数字出版日期: 2015 - 3 - 25 9:39
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150325.0939.017.html

KDR siRNA 融合基因慢病毒载体,并观察其抗肿瘤活性,结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂　TAT-KDR siRNA 慢病毒载体、非小细胞肺癌 A549 细胞株、DH5α 感受态菌(沈阳医学院生物化学及分子生物学研究室保存),细胞培养液、胎牛血清(美国 Hyclone 公司),限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA 电泳胶回收、PCR、质粒抽提试剂盒(大连宝生物公司),抗人 KDR 抗体和羊抗鼠二抗(美国 R&D 公司),荧光实时定量 PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司);引物合成与 DNA 序列测定由大连宝生物公司完成。

1.2　TAT-RGD-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体构建

1.2.1　RGD－4C 序列设计与合成　根据文献[3],设计合成编码 3 个串联 RGD－4C(CDCRGD-CFCGGGGS)的 2 条寡核苷酸链。在正义链和反义链的两端分别引入内切酶位点 KpnⅠ和 HindⅢ。将等摩尔 2 条寡核苷酸链混合,95 ℃变性 10 min,72 ℃退火过夜,获得编码 3 个串联 RGD－4C 的双链 DNA。

1.2.2　pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 载体构建　用 KpnⅠ和 HindⅢ分别对 pGC/TAT KDR siRNA 质粒 DNA 和编码 3 个串联 RGD－4C 的双链 DNA 进行双酶切,纯化酶切产物,在 T4 连接酶作用下16 ℃连接过夜,连接产物转入 DH5α 感受态细胞,常规进行抗生素筛选,阳性菌落经克隆 PCR 鉴定后送检测序;测序结果证实 pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 载体构建成功。

1.2.3　慢病毒载体包装和病毒滴度测定　将 pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 重组载体和慢病毒包装质粒室温下温育 5 min,然后共转染 293T 细胞,培养 8 h 后更换含 10% 胎牛血清的完全改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)培养液,继续培养 48 h,离心后留取含慢病毒颗粒细胞的上清液,倍比稀释法检测病毒滴度。

1.2.4　细胞感染　取对数生长期 A549 细胞,以 2×10^3个/孔接种至 96 孔板,每孔体积 200 μL,培养24 h 后更换无血清培养液,同时设立相应量的 pGC/TAT-KDR siRNA 组、pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组和未转染组,每组设 6 个复孔。各组中分别加入 10 MOI 的 pGC/TAT-KDR siRNA 重组病毒、pGC/TAT-RGD -KDR siRNA 重组病毒,以及等量磷酸盐缓冲液(phosphate belanced solution, PBS)感染 2 h 后,更换成 10% 新鲜小牛血清 DMEM 培养液,待用。

1.3　TAT-RGD-KDR siRNA 转染对 A549 细胞影响

1.3.1　转染对 A549 细胞 KDR 蛋白表达影响　采用 Western blot 法,将感染后的各组细胞培养至细胞贴壁率达到 80% 时,用全蛋白裂解液裂解细胞,细胞裂解物中加入 5 倍十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),上样缓冲液,100 ℃沸水煮 5 min后加样,行 Western blot 分析,山羊抗人 KDR 1∶3 000稀释,兔抗山羊二抗 1∶6 000 稀释。

1.3.2　转染对 A549 细胞 KDR mRNA 表达影响　采用 real-time PCR 法,取对数生长期的各组细胞,Trizol 法提取总 RNA 并逆转录为 cDNA,按照试剂说明书,配制总体系为 20 μL 的反应体系,上机进行 Real Time PCR 扩增和检测。反应条件、引物参照文献[1]。

1.3.3　细胞凋亡检测　(1)噻唑蓝比色法:各组细胞(每组设 6 个复孔)中每间隔 24 h 加入噻唑蓝溶液(5 mg/mL,每孔 20 μL),37 ℃、5% CO_2 继续培养 4 h,加 150 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)低速振荡 10 min,于波长 492 nm 测量各孔吸光度(A)值。实验重复 3 次,取均值。(2)双色流式细胞仪法:用无乙二胺四乙酸的 0.25% 胰蛋白酶收集上述各组细胞,离心后用无菌 PBS 冲洗沉淀,重复 2 次,用 200 μL binding buffer 重悬沉淀后,加入 2 μL AnnexinV-FITC 和 5 μL 碘化丙啶,流式细胞仪检测细胞凋亡率,激发波长为 488 nm,AnnexinV 标记细胞发射波长 525 nm,碘化丙啶标记细胞发射波长 620 nm。

1.3.4　Transwell 侵袭实验　人工基底膜用无血清培养基按 1∶9 比例稀释后加入每个 Transwell 小孔(50 μL/孔),37 ℃条件下培养 3 h,消化并计数对数生长期的各组细胞,每个 Transwell 小室内接种 1×10^5个细胞,培养在 200 μL 含 0.1% 牛血清白蛋白的无血清 DMEM 中,膜下加 500 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h;取出小室,棉棒拭去 Matrigel 和悬浮的细胞,PBS 冲洗 2～3 次,用甲醇、冰乙酸按 3∶1 比例配制的溶液固定 15 min,PBS 多次冲洗后,苏木素复染 30 min;显微镜下随机选取 5 个视野计数膜下细胞数,计算细胞的侵袭率。实验重复 3 次,计算平均值。

$$细胞的侵袭率(\%)=\frac{实验组膜下细胞数}{对照组膜下细胞数}\times100\%$$

1.4　统计分析　实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　TAT-RGD-KDR siRNA 慢病毒载体构建与包装

测序结果经 Blast 比对,重组载体中的 RGD 序列与设计一致,证明 pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 重组载体构建成功。将成功构建的 pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 载体与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,培养 48 h 后留取含慢病毒颗粒细胞的上清液,倍比稀释法进行病毒滴度测定,结果显示病毒滴度为 4×10^9 pfu/L。

2.2　TAT-RGD- KDR siRNA 转染对 A549 细胞 KDR 表达影响(表 1)　结果显示,与对照组比较,pGC/TAT-KDR siRNA 组和 pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 组 A549 细胞 KDR mRNA、蛋白表达水平均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 pGC/TAT-KDR siRNA 组比较,pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 组 A549 细胞 KDR mRNA、蛋白表达水平也明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示与 pGC/TAT-KDR siRNA 比较,pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 转染具有更强的抑制 A549 细胞 KDR 基因表达作用。

表 1　TAT-RGD-KDR siRNA 转染对 A549 细胞 KDR mRNA、蛋白表达影响(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	KDR mRNA	KDR 蛋白
对照组	100 ± 0.00	100 ± 0.00
pGC/TAT-KDR siRNA 转染组	46.3 ± 7.3[a]	38.9 ± 4.2[a]
pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 转染组	22.7 ± 3.9[ab]	19.3 ± 2.7[ab]

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与 pGC/TAT-KDR siRNA 转染组比较,b $P < 0.01$。

2.3　TAT-RGD-KDR siRNA 转染对 A549 细胞增殖影响(表 2)　与对照组比较,pGC/TAT-KDR siRNA 组和 pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组 A549 细胞增殖水平下降,呈时间依赖性;培养 3 d 后,与 pGC/TAT-KDR siRNA 组比较,pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组 A549 细胞增殖水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示 TAT-RGD- KDR siRNA 慢病毒载体具有较强的抑制 A549 细胞增殖作用。

表 2　TAT-RGD-KDR siRNA 转染对 A549 细胞增殖影响(OD, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	培养时间(d)			
	1	2	3	4
对照组	0.63 ± 0.7	0.69 ± 1.2	0.72 ± 0.8	0.87 ± 0.7
pGC/TAT-KDR siRNA 转染组	0.58 ± 1.1	0.43 ± 0.8[a]	0.38 ± 0.4[a]	0.26 ± 0.6[a]
pGC/TAT-RGD-KDR siRNA 转染组	0.53 ± 0.4	0.38 ± 0.5[a]	0.24 ± 0.6[ab]	0.16 ± 0.3[ab]

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与 pGC/TAT-KDR siRNA 转染组比较,b $P < 0.01$。

2.4　TAT-RGD-KDR siRNA 转染对 A549 细胞凋亡影响　结果显示,对照组、pGC/TAT-KDR siRNA 组、pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组 A549 细胞凋亡率为分别为(4.5 ± 0.79)%、(24.36 ± 1.37)%、(52.79 ± 4.39)%;与 pGC/TAT-KDR siRNA 组比较,pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组 A549 细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示 TAT-RGD- KDR siRNA 慢病毒载体具有较强的诱导 A549 细胞凋亡作用。

2.5　TAT-RGD- KDR siRNA 转染对 A549 细胞侵袭力影响　对照组、pGC/TAT-KDR siRNA 组、pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组通过基质胶到达滤膜底层的 A549 细胞数目(膜下细胞数)分别为(202.67 ± 8.50)、(85.59 ± 6.03)和(36.0 ± 5.29)个;与对照组比较,pGC/TAT-KDR siRNA 组和 pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组膜下细胞数明显减少,细胞侵袭率(分别为 42.23%、17.76%)明显下降;与 pGC/TAT-KDR siRNA 组比较,pGC/TAT-RGD KDR siRNA 组下降更明显($P < 0.01$)。提示 pGC/TAT-RGD KDR siRNA 转染具有更强的 A549 细胞体外侵袭抑制能力。

3　讨　论

KDR 是血管细胞生长因子最重要的受体之一,该基因沉默可阻断肿瘤血管生成,抑制肿瘤细胞的生长和转移[4-5]。前期研究中,本课题组构建的 TAT-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体具有细胞感染率高、穿膜作用强等优点,但缺乏肿瘤靶向性。RGD 是一种含有精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸序列的具有生物活性短肽[6-7]。含 RGD 序列的小分子多肽 RGD - 4C 是对整合素 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ 具有高亲和力的配体,广泛存在于哺乳动物细胞中[8]。研究表明,在多种肿瘤动物模型中 RGD - 4C 均显示出良好的肿瘤靶向作用,同时它还可以携带造影剂或偶联的抗肿瘤药物输送至肿瘤组织[9]。此外,利用 RGD - 4C 与整合素的相互作用可以改造腺病毒结构,从而提高腺病毒药物载体对肿瘤细胞的靶向性[10]。

本研究将 3 个串联 RGD - 4C 重组到 TAT-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体的 TAT 下游,构建了 TAT-RGD-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体。Real-time PCR 和 Western blot 结果表明,该载体系

中国公共卫生 CPH

统与 RGD－4C 未介导的 TAT-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体相比，具有更强地抑制人肺癌 A549 细胞 KDR 基因表达的作用；MTT 结果显示，该载体系统对 A549 细胞增殖抑制作用更强，呈时间依赖性；RGD－4C 介导的 TAT-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体转染的 A549 细胞凋亡率可达(52.79 ± 4.39)%，而 RGD－4C 未介导的 TAT-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体转染的 A549 细胞凋亡率仅为(24.36 ± 1.37)%。提示该载体系统具有更强的诱导 A549 细胞凋亡作用；Transwell 侵袭结果显示，该载体能抑制 A549 细胞侵袭力。TAT-RGD-KDR siRNA 融合基因慢病毒载体可为肿瘤的靶向治疗提供理论依据。

参考文献

[1] 郑旭，张俭丽，任玥，等. 穿膜素 TAT 介导的 KDR-siRNA 慢病毒载体的构建及其靶向肺癌 A549 细胞的抗肿瘤作用[J]. 微生物学杂志，2014，26(1)：46－49.

[2] Yu YP, Wang Q, Liu YC, et al. Molecular basis for the targeted binding of RGD-containing peptide to integrin $\alpha_V\beta_3$[J]. Biomaterials, 2014, 35(5): 1667－1675.

[3] Smolarczyk R, Cichoń T, Graja K, et al. Antitumor effect of RGD-4C-GG-D(KLAKLAK)2 peptide in mouse B16(F10) melanoma model[J]. Acta Biochim Pol, 2006, 53(4): 801－805.

[4] Mammoto A, Connor KM, Mammoto T, et al. A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis[J]. Nature, 2009, 457(7233): 1103－1108.

[5] Kim J, Kim SW, Kim WJ. PEI-g-PEG-RGD/small interference RNA polyplex-mediated silencing of vascular endothelial growth factor receptor and its potential as an anti-angiogenic tumor therapeutic strategy[J]. Oligonucleotides, 2011, 21(2): 101－107.

[6] Steri V, Ellison TS, Gontarczyk AM, et al. Acute depletion of endothelial β3-integrin transiently inhibits tumor growth and angiogenesis in mice[J]. Circ Res, 2014, 114(1): 79－87.

[7] Barden S, Lange S, Tegtmeyer N, et al. A helical RGD motif promoting cell adhesion: crystal structures of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system pilus protein CagL[J]. Structure, 2013, 21(11): 1931－1941.

[8] Sarkioja M, Kanerva A, Salo J, et al. Noninvasive imaging for evaluation of the systemic delivery of capsid-modified adenoviruses in an orthotopic model of advanced lung cancer[J]. Cancer, 2006, 107(7): 1578－1588.

[9] Xiao B, Li W, Yang J, et al. RGD-IL-24, a novel tumor-targeted fusion cytokine: expression, purification and functional evaluation[J]. Mol Biotechnol, 2009, 41(2): 138－144.

[10] Pesonen S, Diaconu I, Cerullo V, et al. Integrin targeted oncolytic adenoviruses Ad5-D24-RGD and Ad5-RGD-D24-GMCSF for treatment of patients with advanced chemotherapy refractory solid tumors[J]. Int J Cancer, 2012, 130(8): 1937－1947.

收稿日期：2014－07－01　（解学魁编辑　郑新校对）

· 实验研究 ·

大豆异黄酮持续暴露对小鼠卵巢发育影响*

王文祥，蔡淑凤，张文昌

摘　要：目的　探讨大豆异黄酮对未成年小鼠卵巢发育影响，为雌性生殖发育毒性研究提供实验依据。**方法**　21 d ICR 小鼠 48 只，按体重随机分为对照组，低、中、高剂量大豆异黄酮组(50、100、200 mg/kg)，每日灌胃 1 次，持续 5 周，干预结束后测定血清性激素水平，观察阴门开放时间，计算卵巢脏器系数及各级卵泡构成比。**结果**　高剂量大豆异黄酮组小鼠卵巢系数[(0.436 ± 0.120) mg/g]低于对照组[(0.987 ± 0.420) mg/g]($P < 0.05$)；高剂量大豆异黄酮组小鼠雌二醇水平[(32.96 ± 12.83) pg/mL]明显低于对照组[(53.76 ± 16.44) pg/mL]($P < 0.05$)，而孕酮在各组间差异无统计学意义；与对照组小鼠阴门开放时间[(33.50 ± 2.68) d]比较，中剂量大豆异黄酮组小鼠阴门开放时间[(31.14 ± 1.21) d]提前，差异有统计学意义($P < 0.05$)；大豆异黄酮组小鼠成熟卵泡比例随着剂量增加呈下降趋势，而闭锁卵泡比例呈上升趋势，与对照组比较，高剂量大豆异黄酮组小鼠成熟卵泡比例下降，闭锁卵泡比例上升，差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论**　断乳至性成熟期持续暴露大豆异黄酮，可干扰未成年小鼠卵巢发育。

关键词：大豆异黄酮；小鼠；卵巢发育；性激素

中图分类号：R 114　**文献标志码**：A　**文章编号**：1001-0580(2015)05-0597-03　DOI：10.11847/zgggws2015-31-05-16

Effects of continuous soy isoflavones exposure on ovarian development in mice

WANG Wen-xiang, CAI Shu-feng, ZHANG Wen-chang (*Department of Health Inspection and Quarantine, Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province* 350108,

* **基金项目**：福建省教育厅重点项目(JA13136)

作者单位：福建医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系 环境与健康重点实验室，福建 福州 350108

作者简介：王文祥(1977－)，男，福建安溪人，副教授，博士，研究方向：营养与生殖健康、生殖表观遗传毒理学。

通讯作者：张文昌，E-mail：wenchang2002@sina.com

数字出版日期：2015－3－24 15:57

数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150324.1557.005.html