

# KDR 基因沉默对胃癌 MGC-803 细胞增殖和凋亡的影响

郑 彬, 孙 峰 (慈溪市人民医院, 浙江 慈溪 315310)

**摘要:** [目的] 探讨 *KDR* 基因对胃癌 MGC-803 细胞增殖和凋亡的影响。[方法] 设计及合成 *KDR* 的 siRNA 序列, Lipofectamine™ 2000 转染 MGC-803 细胞。通过 RT-PCR、Western Blot 检测 *KDR* 在干扰后的 mRNA 和蛋白的表达情况, 利用流式细胞仪检测细胞周期, WST-1 法检测细胞增殖活性, TUNEL 法检测细胞凋亡情况。[结果] *KDR* mRNA 和蛋白表达, 观察组较对照组和空白组显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。观察组细胞的生长速度明显减慢, 细胞周期被阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, S 期细胞数减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。转染 *KDR* siRNA 的 MGC-803 细胞的增殖能力明显受到抑制 ( $P < 0.05$ ), 且明显促进了细胞的凋亡, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。[结论] 特异性干扰 *KDR* 基因表达可抑制胃癌 MGC-803 细胞的增殖, 并促进肿瘤细胞凋亡。*KDR* 的 siRNA 序列可能成为治疗胃癌的有效靶点。

**关键词:** 胃肿瘤; *KDR*; siRNA; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)08-0588-05

## Effect of *KDR* Gene Silence on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cell Line MGC-803

ZHENG Bin, SUN Feng

(Cixi People's Hospital, Cixi 315310, China)

**Abstract:** [Purpose] To explore the effect of *KDR* gene in the proliferation and apoptosis of gastric cancer cell MGC-803. [Methods] The siRNA of *KDR* was constructed and transfected into MGC-803 cells with Lipofectamine™ 2000. The expression of *KDR* mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western Blot method. Flow cytometry was used to detect the cell cycle, the cell proliferation was assessed by WST-1 assay, and cell apoptosis was detected by TUNEL. [Results] Compared with the control group and blank group, the mRNA and protein level was significantly decreased in the observation group when transfected with *KDR* siRNA. The growth slowed down and the cell cycle was arrested at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and cell number in S phase was decreased in MGC-803 cell line ( $P > 0.05$ ). After *KDR* siRNA transfection, the proliferation of MGC-803 cells was markedly inhibited and the apoptosis of MGC-803 cells was increased ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Interference of *KDR* gene may suppress cell growth and promote cell apoptosis in MGC-803 cell line. Thus, *KDR* siRNA might be an effective target spot in the treatment for gastric cancer.

**Subject words:** gastric neoplasmas; *KDR*; siRNA; cell proliferation; cell apoptosis

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 尤其是晚期胃癌治疗棘手, 现今寻求对胃癌有效的治疗方法和药物已势在必行<sup>[1-3]</sup>。肿瘤基因是目前研究的热点, 有研究发现 *KDR* 可明显促进肿瘤细胞凋亡, 使细胞活力下降, 有望成为一种新型的抗肿瘤药物<sup>[4-6]</sup>。本研究试图通过探讨 siRNA 沉默 *KDR* 基因对胃癌 MGC-803 细胞增殖及凋亡的影响, 为进一步以 *KDR* 基因为靶点的胃癌基因治疗提供理论依据。

收稿日期: 2012-04-09; 修回日期: 2012-05-27

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

MGC-803 细胞由南京凯基生物科技有限公司提供; RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司, TRIzol 和 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 两步法试剂盒购自 TaKaRa 公司, AMV 逆转录试剂盒由重庆将来试剂公司提

供;cDNA合成试剂盒购自日本 TOYOBO 公司;siRNA 基因片段购自广州锐博生物科技有限公司;兔抗人 KDR 多克隆抗体购自上海未峰生物技术有限公司;阳离子脂质体试剂(Lipofectamine III 2000)购自美国 Invitrogen 公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自北京中衫生物公司;丽春红染液购自广州晶欣生物科技有限公司。RIPA 蛋白裂解液及 BCA 蛋白定量试剂盒购自江苏碧云天公司;ECL 试剂盒购自美国 Thermo 公司。

## 1.2 siRNA 设计、合成及转染

依据文献[7],KDR siRNA 序列为:5'-GCCAC-CAUGUUCUCUAAUATT-3'(正义链),5'-UAUUAGA-GAACAUGGUGGCAT-3'(反义链);阴性对照组 siRNA-ASCR (scramble siRNA) 序列为:5'-UUCUCC-GAACGUGUCACGUTT-3'(正义链),5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAATT-3'(反义链)。均由上海吉玛化学公司合成,MGC-803 细胞培养于含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液(37℃恒温、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度)中。每 3~4d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。按 1×10<sup>5</sup> 个/孔将胃癌 MGC-803 接种于 24 孔板中,当融合率达 70%时以脂质体法进行转染。转染时分为 3 组:转染 pGenesil-1-KDR-siRNA 载体者为 MGC-803/KDRsiRNA 组(观察组),转染随机对照载体者为 MGC-803/control 组(对照组),未转染的胃癌 MGC-803 细胞为 MGC-803 组(空白组)。于转染后 48h 进行 RNA 干扰效应的检测。

## 1.3 半定量 RT-PCR 检测

弃培养液后 PBS 冲洗细胞 3 次,用 TRIzol 法提取总 RNA,通过 cDNA 合成试剂盒反转录合成 cDNA。分别扩增 KDR 和内参 GAPDH。KDR 上游引物:5'-CTGGCATGGTCTFCTGTGAAGCA-3',下游引物:5'-AATACCAGTGGATGTGATGCCG-3',扩增产物 795bp;内参照 GAPDH 上游引物:5'-CGTGGAAG-GACTCATGACCA-3',下游引物:5'-TCCAGGGTCTTACTCCTTG-3',扩增产物为 509bp。PCR 反应条件为 94℃变性 2min,按 94℃变性 45s、62℃退火 1min、72℃延伸 1min 进行反应,循环 35 次,再于 72℃延伸 8min。2%琼脂糖水平板电泳,100V 电压电泳 45min。用凝胶自动成像及分析系统(法国 VI)进行吸光度扫描,用 KDR 吸光度/GAPDH 吸光度值作为 mRNA 表达的相对强度。以上实验重复 3 次。

## 1.4 Western Blot 检测 KDR 的表达

收集细胞提取蛋白并用紫外分光光度法测定蛋白质含量。裂解后加入 3×加样缓冲液混匀,沸水中煮 10min,离心(10 000r/min,r=400mm,5min)。经 15%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后。采用半干转膜法,在转移槽中将蛋白从凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维膜(NC)。上电压 20V,12min。丽春红染液预染并标记蛋白分子量。TBST 缓冲液洗膜,加 TBST 缓冲液稀释的兔抗人 KDR 多克隆抗体(1:200)作为一抗,4℃孵育过夜。加碱性磷酸酶标记 IgG(1:2 000)作为二抗,室温孵育 2h,PBS 洗涤,并采用 ECL 法检测。以上实验重复 3 次。

## 1.5 流式细胞仪检测细胞周期

0.25%胰蛋白酶消化细胞,1 000r/min(离心半径为 17cm)离心 5min 去除培养液,PBS 洗涤 1 次,弃上清并收集细胞,用冰 PBS 洗 2 遍,80%乙醇 4℃过夜,PBS 漂洗 3 次,固定后的细胞用 PBS 洗涤,并重悬于含 0.1mg/ml 碘化丙啶中室温避光染色 30min,采用流式细胞仪检测细胞周期。以上实验重复 3 次。

## 1.6 水溶性四氮唑(WST-1)检测细胞增殖

分别取观察组、对照组和空白组细胞,调整细胞数为 1×10<sup>4</sup> 个/ml,取 200μl 接种于 96 孔细胞培养板中。分别于培养 24、48、72h 后加入 20μl WST-1 试剂继续培养 4h,然后用酶标仪检测 450nm 波长各孔的光密度值(D<sub>450</sub>),每组设立 3 个复合孔。计算增殖抑制率。增殖抑制率(%)=[1-观察组 D<sub>450</sub>值/对照组 D<sub>450</sub>值]×100%。

## 1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡

转染 48h 后,分别收集观察组、对照组和空白组细胞进行细胞爬片,做 TUNEL 染色(方法参照产品说明书)检测细胞凋亡,凋亡细胞细胞核呈棕黄色,每张爬片在高倍镜下分别计数上、下、左、右、中 5 个视野的穿膜细胞数,凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

## 1.8 统计学处理

计量资料均用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间差异采用 SPSS 11.5 软件包进行单因素方差分析,两组间连续变量比较用 *t* 检验,多组间连续变量比较用方差分析,协方差校正,*P*<0.05 为差异有统计学意义。双侧检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 KDR siRNA 抑制 KDR mRNA 的表达

与对照组和空白组比较, KDR mRNA 表达的 RT-PCR 检测观察组见条带明显变窄, 观察组和对照组以及观察组与空白组之间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1、表 1。

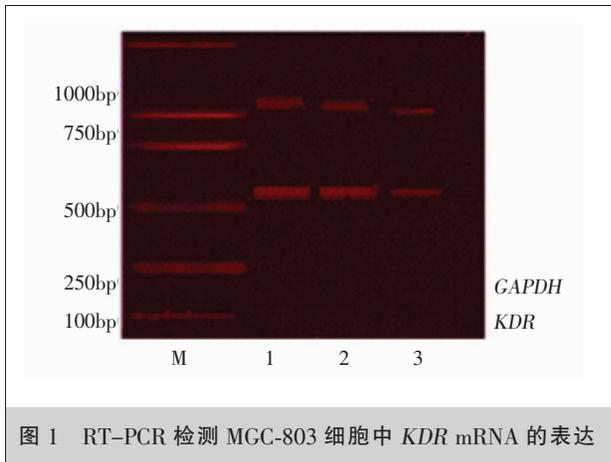


图 1 RT-PCR 检测 MGC-803 细胞中 KDR mRNA 的表达

表 1 siRNA 转染沉默 KDR 基因 48h 后蛋白/ mRNA 的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	KDR 蛋白 (KDR/ $\beta$ -actin)	KDR mRNA (KDR/GAPDH)
①空白组	1.48 $\pm$ 0.10	0.49 $\pm$ 0.04
②对照组	1.50 $\pm$ 0.12	0.48 $\pm$ 0.03
③观察组	0.94 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.02
$t_{3\text{w}1}$	8.3656*	6.5840*
$t_{3\text{w}2}$	7.4611*	7.6861*

\*:  $P < 0.05$ 。

### 2.2 siRNA 抑制 KDR 蛋白的表达

与对照组和空白组比较, 观察组 KDR 蛋白表达的 Western Blot 检测显示条带明显变窄, 其灰度值比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 1。

### 2.3 流式细胞仪检测细胞周期

流式细胞仪分析细胞周期, 结果显示, 在  $G_0/G_1$  期观察组较对照组和空白组略有增加, S 期略有减少。观察组与对照组、空白组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), M 期细胞无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。说明有明显的 S 期阻滞(表 2)。

### 2.4 KDR 基因沉默对细胞增殖的抑制效应

KDR siRNA 对 MGC-803 细胞增殖有明显的抑制作用, 呈现明显的时间依赖性, 观察组转染细胞

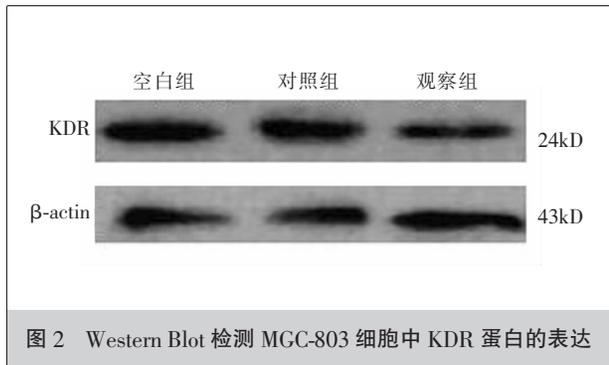


图 2 Western Blot 检测 MGC-803 细胞中 KDR 蛋白的表达

表 2 siRNA 抑制 KDR 表达对 MGC-803 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$G_0/G_1$ 期	S 期	$G_2/M$ 期
①空白组	55.3 $\pm$ 2.9	36.2 $\pm$ 2.1	8.4 $\pm$ 0.7
②对照组	55.3 $\pm$ 2.1	36.7 $\pm$ 2.3	9.6 $\pm$ 1.3
③观察组	69.5 $\pm$ 2.8	20.3 $\pm$ 1.3	10.1 $\pm$ 1.6
$t_{3\text{w}1}$	6.1012*	11.1500*	1.6860*
$t_{3\text{w}2}$	7.0271*	10.7510*	1.4282*

\*:  $P < 0.05$ 。

表 3 KDR siRNA 对 MGC-803 细胞增殖抑制率的影响 (%)

组别	24h	48h	72h
①空白组	0 $\pm$ 0.30	0.30 $\pm$ 0.27	0.50 $\pm$ 0.43
②对照组	0 $\pm$ 0.40	0.30 $\pm$ 0.28	0.40 $\pm$ 0.51
③观察组	11.60 $\pm$ 2.90	41.60 $\pm$ 5.70 $\Delta$	51.60 $\pm$ 6.80
$t_{3\text{w}1}$	6.8914*	12.5350*	12.9890*
$t_{3\text{w}2}$	6.8632*	12.5340*	13.0040*

\*:  $P < 0.05$ ;  $\Delta$ : 与 24h 和 72h 比较,  $P < 0.05$ 。

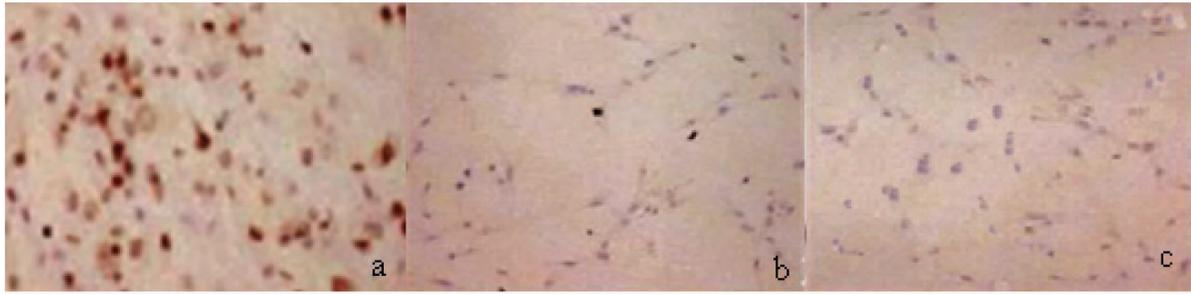
24h 后出现明显的生长抑制, 48h 后抑制作用明显增强, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但对照组和空白组质粒对 MGC-803 细胞没有生长抑制作用 (表 3)。

### 2.5 KDR 基因沉默对细胞凋亡的影响

TUNEL 检测显示, 观察组、空白组和对照组的凋亡率分别为 18.23% $\pm$ 5.40%、7.29% $\pm$ 2.12%、7.46% $\pm$ 2.36%, KDR siRNA 的凋亡细胞明显增加 (图 3), 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 而空白组和对照组细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

KDR 是介导血管内皮生长因子在肿瘤新生血管形成中发挥功能的特异性受体<sup>[8]</sup>。KDR 既在多种恶性肿瘤(包括胃癌细胞)中有较高水平表达, 又可



a:观察组出现大量的凋亡细胞,棕色阳性信号位于细胞核;b、c:对照组和空白组未见凋亡细胞。

图3 TUNEL法检测细胞凋亡( $\times 200$ )

在血管内皮细胞表达,且表达水平与组织及细胞的增生状态有关<sup>[9-11]</sup>。血管内皮细胞通常情况下更新缓慢,KDR受体表达很低,而肿瘤组织中的血管内皮细胞增殖状态比较活跃,所以KDR主要表达于增生活跃的肿瘤细胞以及创伤修复组织中,正常组织几乎不表达<sup>[12,13]</sup>。我们利用肿瘤与正常组织中血管内皮间KDR表达的差异性,设计及合成KDR的siRNA序列,Lipofectamine™2000转染MGC-803细胞,结果显示,观察组转染细胞24h后出现明显的生长抑制,48h后抑制作用明显增强,但对照组和空白组质粒对MGC-803细胞没有生长抑制作用。

KDR在细胞生长和分化中起重要作用,KDR以分泌形式直接作用于肿瘤细胞促进细胞的增殖、凋亡<sup>[14,15]</sup>。本研究发现在转染KDR siRNA的MGC-803细胞中,出现细胞皱缩、核固缩以及凋亡小体形成等细胞凋亡的典型特征,而在未转染KDR siRNA的对照组和空白组未出现细胞凋亡特征。因此可以利用KDR siRNA基因特异性地表达于高度增殖的肿瘤细胞,而对正常组织细胞影响较小的特点来抑制肿瘤细胞的生长。

有研究报道,KDR对人胃癌细胞及血管内皮细胞的增殖、凋亡具有重要的调节作用<sup>[16]</sup>。黄宗海等<sup>[17]</sup>研究通过从细胞形态、细胞膜结构、细胞DNA含量分布等方面观察KDR基因对胃癌细胞的影响,结果显示KDR基因可以诱导胃癌细胞的凋亡。本研究结果也进一步证明了这个观点。总之,特异性干扰KDR基因表达可抑制胃癌MGC-803细胞增殖并促进凋亡,因此,KDR的siRNA序列可能为胃癌的治疗提供新的思路。

### 参考文献:

- [1] 张珑涓,李斌,谢至. Annexin AI在胃癌中的表达及其与胃癌预后的关系[J]. 中山大学学报, 2011, 32(2): 237-241.
- [2] 孔磊,孙景武,张彩虹. 整合素 $\alpha v\beta 6$ 和MMP-9在胃癌中表达及其与胃癌病理生物学特征的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 92-94.
- [3] 王晓瑾,赵晓莹,诸琦.  $\beta$ -榄香烯对胃癌及胃癌耐药细胞杀伤作用的实验研究[J]. 中华消化杂志, 2010, 30(3): 189-192.
- [4] 夏秀丽,张志广,李熈. 塞来昔布联合PDTC对人胃癌细胞株SGC-7901生长的抑制作用[J]. 天津医药, 2011, 39(10): 907-910.
- [5] Lee YC, Cheng TH, Lee JS, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 347(1-2): 103-115.
- [6] Giatromanolaki A, Sivridis E, Bechrakis NE, et al. Phosphorylated pVEGFR2/KDR receptor expression in uveal melanomas: relation with HIF2 $\alpha$  and survival [J]. Clin Exp Metast, 2012, 29(1): 11-17.
- [7] Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replication propagated in human liver cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(5): 2783-2788.
- [8] Tsumuraya M, Kato H, Miyachi K, et al. Comprehensive analysis of genes involved in the malignancy of gastrointestinal stromal tumors [J]. Anticancer Res, 2010, 30(7): 2705-2715.
- [9] Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, et al. Rosuvastatin elicits KDR-dependent vasculogenic response of human placental stem cells through PI3K/AKT pathway [J]. Pharmacol Res,

- 2012, 65(3):275-284.
- [10] Dong G, Guo X, Fu X, et al. Potentially functional genetic variants in KDR gene as prognostic markers in patients with resected colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(3):561-568.
- [11] 李强, 黄宗海, 厉周, 等. 重组腺病毒介导的 KDR-CDglyTK 基因靶向杀伤胃癌细胞的体外实验研究[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(1):16-20.
- [12] Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, et al. Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3[J]. *Lung Cancer*, 2004, 46(1):11-19.
- [13] Schifflers RM, Ansari A, Xu J, et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(19):e149.
- [14] Zhao X, Lu L, Pokhriyal, et al. Overexpression of Rho induces preneoplastic transformation of primary mammary epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2):483-491.
- [15] Delmotte P, Martin B, Paesmans M, et al. VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis[J]. *Rev Mal Respir*, 2002, 19(5 Pt 1):577-584.
- [16] 任娟, 董蕾, 罗金燕. KDR 基因反义寡核苷酸对人胃癌细胞及血管内皮细胞的作用研究[J]. *胃肠病学*, 2002, 11(7):34-35.
- [17] 黄宗海, 李强, 俞金龙. 重组腺病毒介导的 KDR-CDglyTK 基因诱导人胃癌细胞凋亡的研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(3):176-180.

## 《肿瘤学杂志》投稿须知

1. 文稿务必材料可靠, 数据准确, 论点清楚, 论据充足, 结论明确。

2. 文字通顺、准确和简练, 重点突出, 层次清楚。论著需附结构式摘要, 包括目的、方法、结果、结论四部分。中文摘要 200~300 字; 英文摘要务必与中文摘要一一对应翻译。英文摘要前加英文文题、作者姓名汉语拼音、单位英文全称、所在城市名及邮政编码。

3. 所列参考文献限作者亲自阅读的已发表的近 3 年文献为主, 按文内引用先后顺序列于文末, 并在正文内引文处右上角以 [ ] 号注明序号。具体格式举例如下:

期刊: [序号]作者(3 位以下全部写出, 不同作者姓名中间加逗号, 英文文献作者为姓全称, 加名缩写; 3 位以上时只写前 3 位, 于后加“等。”或“et al.)文题[J]. 刊名(英文为缩写), 年, 卷(期): 起页-止页。

书籍: [序号]作者. 书名[M]. 版本. 出版地(即城市名): 出版者, 出版年. 起页-止页。

学位论文: [序号]作者. 学位论文名[D]. 城市: 培养单位, 年。

电子文献: [序号]作者. 题名[电子文献类型]. 可获得的网址, 发表或更新的日期。

其中, 电子文献类型, 是网上期刊时, 用[J/OL]; 是网上电子公告时, 用[EB/OL]; 是网上联机数据库时, 用[DB/OL]。

4. 有通讯作者的文稿, 请在文章首页左下角注明通讯作者职务/职称、学位、工作单位(详细到科室)、详细通讯地址(邮编)和 E-mail。

5. 请 E-mail 投稿, E-mail: zlxzz04@126.com。请勿投寄给个人。文稿以 Word 排版、附件形式发送, 并在主页上注明单位及详细联系方式。同时请寄纸样打印稿 1 份、单位介绍信、基金证明复印件和稿件处理费 20 元。来稿内容若受国家或省、厅级项目资助请在正文首页脚注中说明, 并附基金资助证明复印件。

为了便于与作者(通讯作者)及时联系, 缩短文稿处理的时间, 请作者(通讯作者)务必在邮件主页留下手机号码、E-mail 地址! 本刊将通过电子邮件与作者(通讯作者)联系, 文稿投出后请随时查看所留 E-mail 地址的电子信箱。

6. 编辑部对来稿有文字修改权, 凡涉及内容的修改, 则提请作者考虑, 文责自负。文稿一般不退, 请作者自留底稿。来稿一经录用, 收取一定版面费, 发表后寄赠当期杂志 2 册并酌付稿酬。