

小干扰RNA靶向血管内皮生长因子基因抑制胆囊癌细胞的增殖体内外实验[☆]

曲华伟, 张阳德, 陈玉祥, 赵劲风, 廖明媚, 何剪太

Small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor gene inhibits proliferation of gallbladder cancer cells: An *in vitro* and *in vivo* experiment

Qu Hua-wei, Zhang Yang-de, Chen Yu-xiang, Zhao Jin-feng, Liao Ming-mei, He Jian-tai

Abstract

National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Qu Hua-wei[☆], Studying for doctorate, National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China qhw6619@126.com

Supported by: Doctoral Academic Dissertations Innovation Project of Central South University, No. 2009bsxt006*

Received: 2009-08-04
Accepted: 2009-10-08

中南大学湘雅医院卫生部肝胆肠外科研究中心, 湖南省长沙市 410008

曲华伟[☆], 男, 1979年生, 山东省青州市人, 汉族, 中南大学在读博士, 主要从事内镜及微创外科方面的研究。
qhw6619@126.com

中图分类号: R392.114
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)02-00258-04

收稿日期: 2009-08-04
修回日期: 2009-10-08
(20090804022W · Z)

BACKGROUND: Previous studies demonstrated that proliferation of cancer cells can be inhibited via RNA interference on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). However, few studies report RNA interference on the expression of VEGF in gallbladder carcinoma.

OBJECTIVE: To design and screen shRNA targeting VEGF, and to observe the effect of small interfering RNA targeting on proliferation of gallbladder cancer cells.

METHODS: The VEGF-shRNA fragment was synthesized and connected with pCYU6/GFP/Neo-shRNA plasmid vector. shRNA was transfected into gallbladder cancer cells. The gallbladder carcinoma models of nude mice were prepared and randomly divided into blank control, negative control and experimental groups, with 6 animals in each group. shRNA was injected into tumor. Cell growth was detected by fluorescence microscope MTT. The RNA interference efficiency was examined by fluorescent quantitative RT-PCR. Changes of tumor volume were also observed.

RESULTS AND CONCLUSION: Gallbladder cancer cells were shrunk with round shapes and a part of cells were dead after RNA interference on VEGF. shRNA-VEGF1 and shRNA-VEGF2 could significantly inhibit mRNA gene expression of VEGF, the inhibition ratio was 86% and 82%, respectively. The tumor volume of the experimental group was smaller than the other groups, with slowly growth ($P < 0.05$). No obvious changes were found in the blank control and negative control groups. The constructed hVEGF-shRNA vector markedly decreases VEGF gene expression and inhibits cellular proliferation, eventually, to treat gallbladder cancer.

Qu HW, Zhang YD, Chen YX, Zhao JF, Liao MM, He JT. Small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor gene inhibits proliferation of gallbladder cancer cells: An *in vitro* and *in vivo* experiment. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Lincunhuang Kangfu. 2010;14(2): 258-261. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 已有研究发现 RNA 干扰可通过抑制血管内皮生长因子基因表达抑制肿瘤细胞增殖, 但目前关于应用 RNA 干扰胆囊癌血管内皮生长表达的研究国内外尚无相关报道。

目的: 构建并筛选靶向血管内皮生长因子的 shRNA, 观察 RNA 干扰血管内皮生长因子的效果及对胆囊癌细胞增殖的影响。

方法: 设计 VEGF-shRNA 片段, 连接到 pCYU6/GFP/Neo-shRNA 质粒载体上。shRNA 转染胆囊癌细胞。建立裸鼠胆囊癌模型, 随机分成空白组、阴性对照组、实验组(干扰 pShRNA-VEGF2), 每组 6 只。瘤内注射 shRNA。荧光显微镜观察细胞生长状态, 半定量反转录-聚合酶链反应法与实时荧光定量聚合酶链反应检测 RNA 干扰效果, 观察胆囊癌裸鼠模型肿瘤体积变化。

结果与结论: RNA 干扰血管内皮生长因子后, 胆囊癌细胞细胞变圆, 皱缩, 部分细胞死亡脱落。shRNA 片段血管内皮生长因子 2、血管内皮生长因子 1 均可抑制 VEGF mRNA 表达, 抑制率可达 86%, 82%。裸鼠肿瘤模型中实验组肿瘤与对照组、阴性组相比明显变小, 且生长缓慢($P < 0.05$), 而对照组和阴性组在肿瘤大小及生长趋势上没有明显的差别。实验构建的 hVEGF-shRNA 质粒表达载体通过抑制血管内皮生长因子的表达, 抑制胆囊癌细胞增殖, 从而达到间接治疗肿瘤的目的。

关键词: RNA 干扰; shRNA; 胆囊癌细胞; 血管内皮生长因子; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.02.016

曲华伟, 何剪太, 陈玉祥, 赵劲风, 廖明媚, 张阳德. 小干扰 RNA 靶向血管内皮生长因子基因抑制胆囊癌细胞的增殖体内外实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(2):258-261. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

新生血管的生成是肿瘤细胞发展成为临床可测及肿瘤的决定因素。在众多与血管有关的因子中, 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 被确认为是内皮细胞最有效的有丝分裂原。2000年 NATURE 杂志著文所述: 只有 VEGF 被确认具有高度特异及有效的促新生血管形成作用^[1]。RNAi 是通过

siRNA 介导识别细胞内同源靶基因 mRNA 分子, 在 RNA 诱导沉默复合体作用下切割相应的靶基因 mRNA, 阻断翻译过程, 发挥基因沉默效果^[2]。实验拟通过 RNA 干扰抑制胆囊癌血管内皮生长因子基因的表达, 观察其对胆囊癌 GBC-SD 细胞的影响。

1 材料和方法

设计: 观察性试验。

时间及地点: 实验于2009/01-06在中南大学湘雅医院卫生部肝胆肠外科研究中心及中南大学动物学部完成。

材料: 人胆囊癌细胞株GBC-SD购于同济大学肿瘤研究所。Lipofectamine2000试剂购自Invitrogen公司。BALB/c裸鼠购自上海莱斯克实验动物有限公司。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[3]。

实验方法:

VEGF-shRNA片段设计与合成: 在美国生物信息中心NCBI数据库中获取人VEGF序列全长, 结合文献报道^[4-6], 确定4个VEGF-shRNA序列与阴性对照序列。

序列:

VEGF-1:

5-CAC CGT GGG TGC ATT GGA GCC TTG TTC AAG AGA
CAA GGC TCC AAT GCA CCC ATT TTT TG-3'(正义链);

VEGF-2:

5-CAC CGG GCC AGC ACA TAG GAG AGA TTC AAG AGA
TCT CTC CTA TGT GCT GGC CTT TTT TG-3'(正义链);

VEGF-3:

5-CAC CGC TAC TGC CAT CCA ATC GAT TCA AGA GAT
CGA TTG GAT GGC AGT AGC TTT TTT G-3'(正义链);

VEGF-4:

5-CAC CTC ATC ACG AAG TGG TGA AGT TCA AGA GAC
TTC ACC ACT TCG TGA TGA TTT TTT G-3'(正义链);

Negative Control:

5'-CAC CGT TCT CCG AAC GTG TCA CGT CAA GAG ATT
ACG TGA CAC GTT CGG AGA ATT TTT T G-3'(正义链)。

pCYU6/GFP/Neo-shRNA载体的构建由上海创翼生物科技有限公司完成。

shRNA的转染胆囊癌细胞: 参照Invitrogen公司Lipofectamine2000转染试剂说明书, 取对数生长期GBC-SD细胞接种于6孔板。取6 μg shRNA, 5 μL LipofectamineTM2000脂质体, 轻轻混匀, 室温放置5 min, 加入6孔板中, 温育6 min, 弃转染液, 加入RPMI1640完全培养液, 继续培养48 min。

实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测RNA干扰效果: 首先提取总RNA, 与DEPC-H₂O 7.5 μL 70 $^{\circ}\text{C}$ 混合温育5 min, 冰上骤冷。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育10 min, 然后42 $^{\circ}\text{C}$ 温育2 h。70 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min终止反应, 冰上骤冷, 反应液用作PCR模板。配制PCR反应液, 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性40 s, Ta $^{\circ}\text{C}$ 退火40 s (GAPDH为60 $^{\circ}\text{C}$, VEGF为59 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s, 30个循环。PCR反应结束后, 取5 μL 用于琼脂糖凝胶电泳检查并照相。

裸鼠抑瘤实验: 将胆囊癌细胞悬液, 以 2×10^6 个细胞接种于裸鼠右股部外侧皮下, 以皮下结节直径超过0.5 cm为成瘤标准。通过PCR检测RNA干扰效果, 将干扰效率最高的作为试验干扰组。裸鼠随机分成3组: 空白组、阴性对照组、实验组(干扰pShRNA-VEGF2), 每

组6只。实验组在裸鼠移植瘤内缓慢注射shRNA与转染试剂混合物(200 μL), 每3天1次, 连续治疗4周。阴性对照组与空白组: 分别同法注射转染试剂与PBS液200 μL 。治疗4周后处死裸鼠, 测量肿瘤体积。

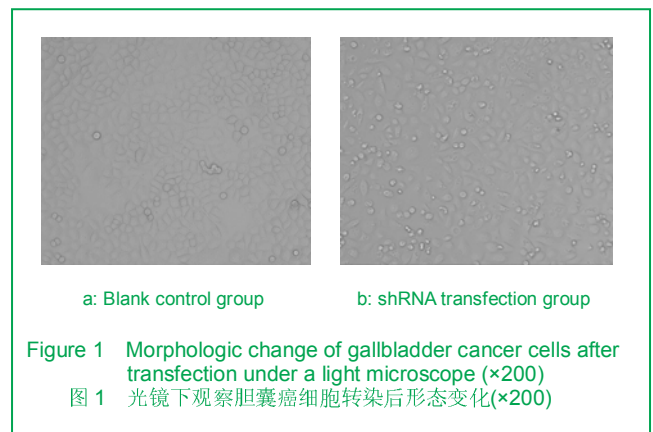
主要观察指标: RNA干扰VEGF对胆囊癌细胞形态的影响, 实时荧光定量PCR检测shRNA片段对VEGF基因mRNA的表达抑制情况。裸鼠体内成瘤试验观察RNA干扰对体内胆囊癌肿瘤生长的影响。

设计、实施、评估者: 设计为第一, 二, 六作者, 实施为第一, 三, 四, 五作者, 评估为第一, 二, 六作者, 所有作者均受过分子生物学试验的专业培训。

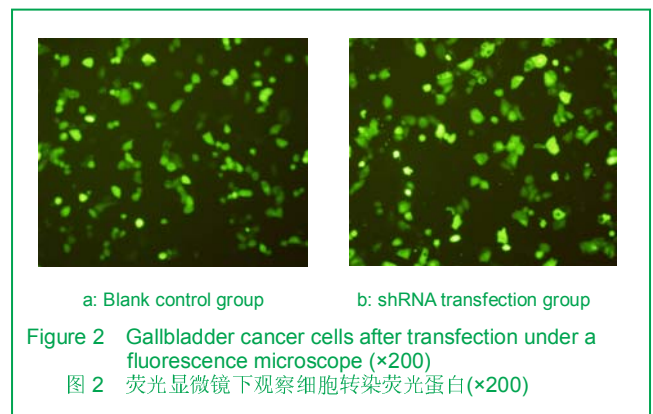
统计学分析: 由第一作者用SPSS 13.0软件进行统计分析。组内同一时间点组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 RNA干扰VEGF对胆囊癌细胞生长抑制作用 光镜下观察转染sh-VEGF 48 h后, 胆囊癌细胞形态发生明显变化。细胞变圆, 皱缩, 部分细胞死亡脱落。见图1。



荧光显微镜观察细胞转染情况见图2, 细胞计数统计得到转染效率约为58.6%。



2.2 real-time PCR法检测RNA干扰效果 采用相对定量法, 对转染shRNA后的GBC-SD细胞内VEGF基因相

对于GAPDH内参基因的表达变化。PCR扩增后, 设定阈值线为0.2, 采集对应的CT值, 然后按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行分析处理, 所得数据对内参基因gapdh进行均一化处理, 然后得到样品组相对于空白对照组的基因表达变化。见表3, 图3。

表3 Real-time PCR 数据的相对定量分析
Table 3 Relative quantitative assay of real-time PCR data

Group	Gapdh CT (AveCT±SD)	VEGF CT (AveCT±SD)	ΔCT±SD (CTVEGF-CTGAPDH)	ΔΔCT±SD (sample-NC)	Sample/NC (2-ΔΔCT)
MOCK control	16.67	17.70	1.03	0.10	0.932 465
VEGF2	16.07	19.09	3.02	2.89	0.135 158
VEGF 3	16.78	19.44	2.66	2.48	0.179 244
VEGF 1	16.48	19.29	2.81	2.65	0.159 540
VEGF 4	16.34	18.01	1.67	1.25	0.421 794
Negative control	16.47	17.52	1.05	0.16	0.895 248
Blank control	16.89	17.89	1.00	0.00	1

从real-time PCR的分析结果可以看到, shRNA片段VEGF-2、VEGF1均可以显著抑制VEGF基因的mRNA表达, 抑制率可达86%, 82%(相对于空白组)。

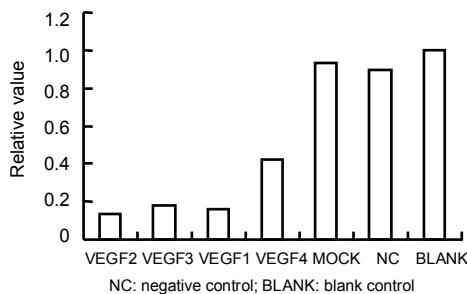


Figure 3 VEGF gene changes with reference gene
图3 VEGF 基因相对于内参基因的变化图

2.3 裸鼠体内实验结果 通过检测裸鼠皮下肿瘤体积, 可以看出实验组肿瘤与对照组, 阴性组明显变小, 且生长缓慢($P < 0.05$), 而对照组和阴性组在肿瘤大小及生长趋势上差异无显著性($P > 0.05$)。见图4, 5。

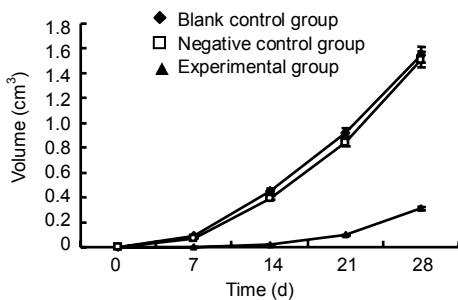
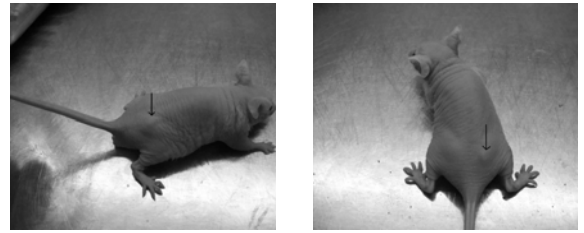
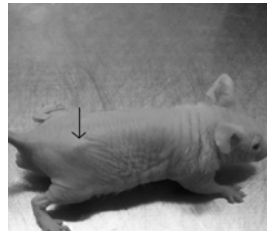


Figure 4 Volume changes of nude mouse subcutaneous tumor
图4 裸鼠皮下肿瘤治疗前后体积变化



a: Prior to shRNA injection

b: Volume of subcutaneous tumor was slowly increased after shRNA injection



c: Prior to plasmid injection

d: Volume of subcutaneous tumor was quickly increased after plasmid injection

Figure 5 Volume changes of nude mouse subcutaneous tumor after treatment (Black arrow indicates subcutaneous tumor)

图5 裸鼠皮下肿瘤治疗前后体积变化

3 讨论

1971年美国Folkman博士提出肿瘤细胞生长依赖于血液供应的观点。近年来国内外学者对与胆囊癌相关基因作了一系列研究^[7-9], 认为肿瘤血管生成在肿瘤产生、发展和转移过程中起关键作用^[10-11]。目前研究发现与肿瘤血管生成有关的因子中VEGF能特异地促进细胞分裂、增殖及迁移, 在肿瘤新生血管生成过程中起着至关重要的作用^[4, 12]。研究证实, VEGF具有促进血管内皮细胞增殖, 增加血管通透性, 抑制肿瘤细胞的凋亡等功能。由于VEGF的功能强大, 故已成为恶性肿瘤基因治疗的靶点^[5, 6, 13]。胆囊癌是胆道系统最常见的恶性肿瘤, 发病率在中国逐年增高。目前, 胆囊癌5年生存率低于5%^[14-16]。综合治疗是在目前临床治疗水平基础上的必然选择。积极探索胆囊癌的基因治疗具有非常重要的意义。针对在胆囊癌中高表达的VEGF展开抗血管生成的肿瘤治疗研究具有重要意义^[17-18]。

RNAi为一种双链RNA分子, 在mRNA水平上关闭相对应序列的基因表达或使其沉默的过程, 可以特异性阻断真核细胞中蛋白的表达^[19], 是转录后水平的沉默^[20]。在RNAi的效应阶段中, siRNA在TAR-RNA结合蛋白的参与下结合到核糖核苷酸酶复合物上形成RNA诱导的基因沉默复合体(RISC)。激活的RISC通过碱基配对定位到同源mRNA上, 在配对碱基的第10与11碱基之间切割并降解靶mRNA^[21], 最后再被核酸外切酶进一步降解, 从而干扰基因表达^[22]。

如何有效抑制VEGF的表达是肿瘤治疗的关键所在。目前研究较多的有抗VEGF及VEGFR的单克隆抗

体^[23], 反义寡核苷酸基因干涉^[24], VEGF 片段等近来兴起的 RNA 干扰技术^[25], 为肿瘤的生物治疗开辟了新的途径。自 1998 年 Fire 等^[26]发现 RNA 干扰以来, 已经成功的在各种哺乳动物体外系统中实现了 RNA 干扰。与传统基因沉默技术相比, 具有效果强、持续时间长、技术流程简便、短周期等优势^[27]。作者采用了以质粒为载体介导的 RNA 干扰。实验采用以质粒为载体构建重组体的方法, 将 siRNA 对应的 DNA 双链序列 (shRNA 质粒表达载体) 克隆入载体内, 这样就能在体内表达所需的 siRNA 分子。优点是使 siRNA 直接在体内得到稳定表达。实验以脂质体作为转染试剂, 将体外培养的胆囊癌 GBC-SD 细胞转染 VEGF siRNA 后, 从形态学证实了对肿瘤细胞生长的抑制。通过 RT-PCR 检测到 VEGF mRNA 表达减少, 证实了 RNA 干扰对靶基因的沉默效果。在裸鼠成瘤抑瘤实验中, 通过将 shRNA 与 Lipo2000 脂质体混合后注射入移植瘤体内, 观察到移植瘤体积增长明显减缓, 验证了通过 RNA 干扰胆囊癌细胞 VEGF 抑制肿瘤组织生长。当然, 肿瘤体积虽增长缓慢, 但是并没有消失, 说明肿瘤生长机制复杂, 是多种因素综合作用的结果。其他学者通过 RNA 干扰技术, 已有抑制结肠癌、前列腺癌和视网膜母细胞瘤以及肺癌细胞的 VEGF 基因的表达的报道^[28-31]。

4 参考文献

- George D, Yancopoulos, Samuel Davis, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407(6801):242-248.
- Colmenares SU, Buker SM, Buhler M, et al. Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi. *Mol Cell*. 2007; 27(3):449.
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, et al. Short Interfering RNA Mediated Gene Silencing of Vascular Endothelial Growth Factor: Effects on Cellular Proliferation in Colon Cancer Cells. *Arch Surg*. 2006; 141(4):367-374.
- Wannenes F, Ciafre SA, Niola F, et al. Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-A significantly limits vascularization and growth of prostate cancer in vivo. *Cancer Gene Ther*. 2005; 12(12):926-934.
- Murata M, Takanami T, Shimizu S, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by diced small interfering RNAs (siRNAs) specific to vascular endothelial growth factor (VEGF). *Curr Eye Res*. 2006; 31(2):171-180.
- Yang ZL, Li YG, Zhong DW, et al. *Zhonghua Shiyuan Waikexue*. 2000; 17(1):16-17. 杨竹林, 李永国, 钟德珩, 等. 胆系恶性肿瘤上皮钙粘素和连环素的表达及其意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(1):16-17.
- Tu JF, Jiang FZ, Chen BC. *Zhonghua Shiyuan Waikexue*. 2000; 17(1):20-21. 屠金夫, 蒋飞照, 陈必成. 原发性胆囊癌细胞增生与细胞周期素 E 表达的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(1):20-21.
- Cao LP, Zhai XM, Peng SY, et al. *Zhonghua Shiyuan Waikexue*. 1999; 16(5):402-403. 曹利平, 翟晓墨, 彭淑麟, 等. K-67 抗原在胆囊良恶性肿瘤中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 1999, 16(5):402-403.
- Choi HJ, Hyun MS, Jung G J, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology*. 1998; 55:575-581.
- Fong Y, Jamagin W, Blumgart LH, et al. Gallbladder cancer: comparison of patients presenting initially for definitive operation with those presenting after prior noncurative intervention. *Ann Surg*. 2000; 232:557.
- Potgens AJ, Westphal HR, Waal RM, et al. The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 1995; 376:57-70.
- Lu PY, Xie FY, Woodle MC. Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics. *Trends Mol Med*. 2005; 11(3):104-113.
- Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2002; 20(5):446-448.
- Shi JS, Sun XJ, Xi'an Jiaotong Daxue Xuebao. 2007; 28(5):473-481. 石景森, 孙学军. 原发性胆囊癌诊治的历史、现状及展望[J]. *西安交通大学学报*, 2007, 28(5):473-481.
- Lai EC, Lau WY. Aggressive surgical resection for carcinoma of gallbladder. *ANZ J Surg*. 2005; 75:441.
- Liu JM, Shiyong Yiji Zazhi. 2006; 13(17):2976-2977. 刘建民. 血管内皮生长因子与胆囊癌病理生物学行为及预后的关系[J]. *实用医技杂志*, 2006, 13(17):2976-2977.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989; 246(4935):1306-1309.
- Deans TL, Cantor CR, Collins JJ. A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells. *Cell*. 2007; 130(2):363-372.
- Wurst M, Robles A, Po J, et al. An RNAi screen of the RRM-domain proteins of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009; 163(1):61-65.
- Parker GS, Maity TS, Bass BL. dsRNA binding properties of RDE-4 and TRBP reflect their distinct roles in RNAi. *J Mol Biol*. 2008; 384(4):967-979.
- Colmenares SU, Buker SM, Buhler M, et al. Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi. *Mol Cell*. 2007; 27(3):449-461.
- Shaochuang Wang, Hui Liu, Lifeng Ren, et al. Inhibiting Colorectal Carcinoma Growth and Metastasis By Blocking the Expression of VEGF Using RNA Interference neoplasia. 2008; 10(4):399-407.
- Wang Q, Liu S, Yan Shiguangxue Zazhi. 2007; 9(6):391-394. 王茜, 刘苏. RNA 干扰抑制视网膜母细胞瘤血管内皮生长因子基因的表达[J]. *眼视光学杂志*, 2007, 9(6):391-394.
- Brekken RA, Overholser J P, Stastrup VA, et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor (KDR/Flk1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res*. 2000; 60(18):5117-5124.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391:806-811.
- Yang CY, Cai L. RNAi and non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer*. 2008; 11(4):595-597.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 212 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411(6836):494-498.
- Fan Y, Zhang YL, Zhang YC, et al. *Jiangsu Daxue Xuebao: Yixueban*. 2007; 17(1):46-48. 范钰, 张允历, 张宇川, 等. siRNA 剔除 ST AT3 基因对大肠癌 LS174T 细胞侵袭的抑制[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2007, 17(1):46-48.
- Pan ZH, Chen ZD. *Zhonghua Nanxue Zazhi*. 2006; 12(12):1095-1098. 潘周辉, 陈昭典. RNA 干扰对前列腺癌 PC-3 细胞血管内皮生长因子表达的研究[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(12):1095-1098.
- Zhang Y, Gu Zhong P, Zhou YA, et al. *Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi*. 2009; 25(4):341-347. 张泳, 谷仲平, 周勇安, 等. RNAi 沉默 VEGF 的表达及其治疗肺癌的初步研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(4):341-347.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 中南大学博士研究生学位论文创新项目资助 (2009bsxt006)。

设计或课题的缺陷与不足: 课题设计的 shRNA 转染胆囊癌细胞后, 只是针对瞬时转染进行了相关实验, 未能观察其长时间的表达, 即 GBC-SD 稳转细胞株的建立, 并进行进一步相关分子生物学的分析, 为本次实验之遗憾。

同行评价: 血管内皮生长因子通过促进新生血管生成, 在肿瘤的生成和发展中有确切的重要作用。实验应用 RNA 干扰技术靶向抑制血管内皮生长因子基因表达, 体内外实验发现可以达到抑制胆囊癌细胞的增殖和胆囊癌肿瘤生长的作用, 为胆囊癌的基因治疗有一定的指导意义。

提供临床借鉴的价值: 实验结果表明, 所构建的 hVEGF-shRNA 质粒表达载体通过抑制血管内皮生长因子的表达, 抑制胆囊癌细胞恶性增殖的作用, 期望能为胆囊癌基因治疗提供理论基础。