论著

文章编号:1000-5404(2009)12-1164-04

# RNA干扰Hsp70基因表达抑制胃癌细胞增殖

张 滨[1],姜 政[2],李 彦[2],向廷秀[3],陶小红[2],王丕龙[2] (重庆医科大学:[1]公共卫生学院社会医学与人口学教研室,[2]附属第一医院消化内科,[3]附属第一医院实验研究中心,重庆 400016)

**摘 要:目的** 构建Hsp70的短发夹状RNA(shRNA),检测其在胃癌细胞株SGC-7901中对Hsp70基因表达的抑制作用以及对肿瘤细胞增殖的影响。**方法** 根据Hsp70编码基因,设计并合成2对反向重复序列,同时设计1对与目的基因不相匹配的重复序列作为对照组分别定向克隆至载体pTZU6+1的U6转录启动子下,构建重组质粒phsp1-siRNA,phsp2-siRNA及对照组质粒phsp3-siRNA,分别转染胃癌细胞株SGC-7901,采用RT-PCR和Western blot检测phsp-siRNA对Hsp70基因表达的抑制作用。利用AlamarBlue法检测转染后对胃癌细胞生长的影响。**结果** 酶切电泳分析和DNA测序证实重组质粒phsp-siRNA构建成功;证实phsp1-siRNA和phsp2-siRNA对内源性Hsp70基因的表达有明显的抑制作用,同时phsp1-siRNA和phsp2-siRNA转染组细胞的生长较对照组受到明显抑制。**结论** 构建的重组质粒phsp1-siRNA和phsp2-siRNA能特异而有效抑制内源性Hsp70基因在SGC-7901细胞中的表达,并对细胞生长有明显抑制作用。

**关键词:** RNA干扰;Hsp70;短发夹状RNA;SGC-7901
**中图法分类号:** R394-33;R73-362;R735.2 **文献标识码:** A

# RNA interference-mediated silencing of the Hsp70 gene inhibits human gastric cancer cell growth

ZHANG Bin[1], JIANG Zhen[1], LI Yan[2], XIANG Ting-xiu[3], TAO Xiao-hong[2], WANG Pi-long[2] ([1]Department of Social Medicine and Population, School of Public Health; [2]Department of Gastroenterology, [3]Laboratory Center, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Objective To construct the plasmids containing short hairpin RNA of Hsp70 for knockdown of the expression of Hsp70 and investigate the effects on cell proliferation in gastric cancer cell line. Methods We designed two pairs of reversed duplicate sequence and a pair of reversed duplicate mismatched sequence along with a negative control, which were inserted into contrivance promotor U6 of pTZU6+1 to generate recombinant plasmids, the phsp1-siRNA, phsp2-siRNA and phsp3-siRNA, respectively. The recombinant plasmids were then transfected into human gastric carcinoma cell SGC-7901 for the detection of Hsp70 expression, respectively. The inhibition of cell proliferation was examined by AlamarBlue method. Results Electrophoretic analysis and sequencing showed that the recombinant plasmids of phsp1-siRNA and phsp2-siRNA were successfully constructed. After the recombinant plasmids of phsp-siRNA were transfected into the cells of SGC-7901, the expressions of Hsp70 in the phsp1-siRNA and phsp2-siRNA group were down-regulated more significantly than those in the control ones, and the inhibition rate was higher than that in the control ones through AlamarBlue. Conclusion The constructed recombinant plasmids of phsp1-siRNA and phsp2-siRNA can efficiently suppress the expression of Hsp70 in SGC-7901 cells, which may be a basic foundation for the genetic therapy of gastric cancer in the future.

**Key words:** RNA interference; Hsp70; short hairpin RNA; SGC-7901

---

**基金项目:** 重庆市自然科学基金(2005BB5031)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5031)
**作者简介:** 张 滨,男,重庆市人,硕士,副教授,主要从事全科医学和社会医学方面的研究。E-mail:zhangbin_127@163.com
**通信作者:** 姜 政,E-mail:jiangz1753@163.com
**收稿日期:** 2008-09-01;**修回日期:** 2008-10-15

热休克蛋白 70(heat stress protein70, Hsp70)在肿瘤治疗中的作用越来越受到重视[1-3],大量研究表明 Hsp70 是抗凋亡蛋白,具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用。因此,本实验应用转录载体 pTZU6 + 1 构建 Hsp70 的短发夹状 RNA (small hairpin RNA,shRNA)沉寂目的基因 Hsp70,检测 Hsp70 在肿瘤细胞中的转录和表达以及胃癌细胞生长的影响,为进一步探讨其对胃癌的基因治疗奠定基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验材料

人胃癌细胞株 SGC-7901,购于重庆医科大学病理生理教研室;质粒 pTZU6 + 1 由本校感染性疾病分子生物学重点实验室黄爱龙教授惠赠;大肠杆菌 JM109 由本校感染性疾病分子生物学重点实验室保存;内切酶 *Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ等购自 TaKaRa 公司;小量质粒提取试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒和 DNA 纯化试剂盒均为 Sigma 公司产品,RT-PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司;转染试剂 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司,DNA 片段由上海生三博远志生物工程公司合成;兔抗人 Hsp70 多抗为美国 Santa Cruz 公司产品;HRP 标记的羊抗兔 IgG(二抗),DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术公司。

### 1.2　实验方法

1.2.1　shRNA 的设计和构建　　根据 GenBank 中报道的 cDNA 序列,参考 siRNA 的设计原则,利用 Ambion 公司 siRNA 在线设计软件设计 2 条长为 21 个碱基的靶定序列,另设计缺失 3 个碱基的序列;中间为 4 个或 8 个与目的基因无同源性的插入序列 (TTCG 或 TTAGTACT) 形成发夹,末端终止子为 TTTTT,并利用 BLAST 进行查询,确定其为特异性序列,合成的 DNA 两端设计有 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切位点,便于与 pTZU6 + 1 载体连接。具体的序列见表 1。

1.2.2　重组载体 siRNA 的构建　　将 3 对合成的寡核苷酸分别溶解在 66 μl 退火缓冲液中,终浓度为 0.5 μg/μl。正义引物和反义引物各取 20 μl 混匀,在 95 ℃孵育 5 min,缓慢冷却至 4 ℃,用 DNA 纯化试剂盒纯化。pTZU6 + 1 质粒用内切酶 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切,胶回收酶切完全的载体大片段。按照文献[4]所述方法进行重组质粒的筛选,并进行鉴定,以证实目的 DNA 片段克隆入 pTZU6 + 1 载体,分别称为 phsp1-siRNA、phsp2-siRNA 和 phsp3-siRNA。

1.2.3　序列分析　　将筛选的重组质粒送重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室测序部进行序列分析,以证实目的 DNA 片段克隆入 pTZU6 + 1 载体。

1.2.4　大量提取去内毒素重组质粒 DNA　　为减少内毒素对培养细胞的毒性作用,应用 Sigma EndoFreeplasmid Maxi Kit 提取重组质粒 phsp-siRNA 的 DNA,其操作方法按试剂操作说明进行。最后将提取的质粒溶于去内毒素的 TE 平衡液中,并对所得的质粒进行定量分析。

1.2.5　细胞培养与转染　　按照文献[5]所述方法进行细胞培养与转染并按以下分组进行实验:①pTZU6 + 1 组;②phsp1-siRNA 组;③phsp2-siRNA 组;④phsp3-siRNA 组;⑤空白组。每组转染过程根据 Invitrogen 转染试剂盒说明书进行,转染完毕后将细胞置于 37 ℃孵箱中继续培养,4 ~ 6 h 后加入含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液;继续培养 72 h 后用 RT-PCR 和 Western blot 检测 Hsp70 表达的变化。

1.2.6　半定量 RT-PCR 检测 Hsp70 mRNA 表达　　转染细胞 72 h,分别收集各组细胞,提取细胞总 RNA,采用 Qiagen 公司的 RT-PCR 一步法试剂盒进行实验。以 GAPDH 作为内参,并设相应的阴性对照。RT-PCR 反应体系中加入 2 对引物:Hsp70 引物: P1: 5′-ATGGCCAAAGCCGCGGCAGTCG-3′, P2: 5′-CATCCCCGATGAGCCGCTCG-3′,扩增产物 160 bp;GAPDH 引物:P1: 5′-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′, P2: 5′-GACCACCTGGTGCTCAGTGT-3′,扩增产物 821 bp。反应条件为 50 ℃ 30 min, 94 ℃ 5 min,94 ℃ 55 s,54 ℃ 55 s,72 ℃ 55 s,35 个循环,扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.7　Western blot 检测 Hsp70 表达　　转染 72 h 后收集各组 SGC-7901 细胞,离心并去上清后,每管沉淀加 100 μl 蛋白上样 Buffer 煮沸 5 min,混匀,进行 10% SDS-PAGE 电泳,而后再进行电转至 PVDF 膜上,按 0.2 ml/cm$^2$ 膜的比例先后加入第一和第二抗体溶液,按照文献[5]所述方法进行封闭、洗涤和显色,并通过 Quantity one 4.52 图像分析软件进行图像分析。

1.2.8　AlamarBlue 法检测细胞增殖　　将对数生长期 SGC-7901 细胞制备成 $5 \times 10^4$/ml 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,于 37 ℃,5% $CO_2$ 的培养箱孵育。24 h 后加不同的处理因素。设 pTZU6 + 1 空载体转染的阴性对照组和接种细胞但不加处理因素的空白对照组,每组设 3 个复孔。分别继续培养 1、2、3、4 d,结束培养前 4 h,每孔加入 AlamarBlue 20 μl,用酶标仪在 570 和 620 nm 2 个波长上测定各孔 *OD* 值,按以下公式计算:AlamarBlue 还原率(%) = [$D$(540) − $D$(620) × R] × 100; R = [$D$(A540) − $D$(R540)]/[$D$(A620) − $D$(R620)], [$D$(540]:波长 540 nm 时样本的吸光度;$D$(620):波长 620 nm

**表 1　设计 3 对针对 Hsp70 cDNA 靶定寡核苷酸序列**

| 序列 | 寡核苷酸序列(5′-3′) |
|---|---|
| 1(1069-1088)CGTGCTCATCTTTGACCTG | TCGACCGTGCTCATCTTTGACCTGTTCGCAGGTCAAAGATGAGCACGTTTTTCTAGAAAAACGTGCTCATCTTTGACCTGCG-AACAGGTCAAAGATGAGCACGG |
| 2(1841-1860)GACAACAATCTGTTGGGGC | TCGACGACAACAATCTGTTGGGGCTTAGTACTGCCCCAACAGATTGTTGTCTTTTTCTAGAAAAAGACAACAATCTGTTGG-GGCAGTACTAAGCCCCAACAGATTGTTGTCC |
| 3(与目的基因不匹配) | TCGACCAAGATCACCATCACCAACTTAGTACTGTTGGTGATGGTGATCTTGTTTTTCTAGAAAAACAAGATCACCATCACC-AACAGTACTAAGTTGGTGA-TGGTGATCTTGG |

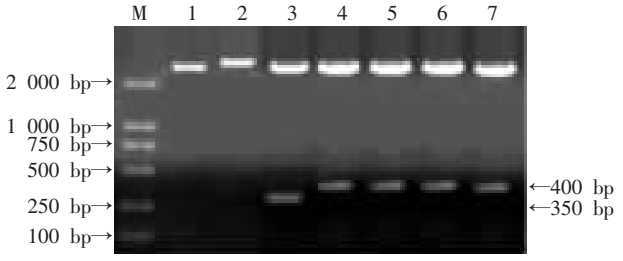
时样本的吸光度;*D*(A540):波长 540 nm 时 AlamarBlue 对照的吸光度;*D*(R540):波长 540 nm 时 RPMI1640 对照的吸光度;*D*(A620):波长 620 nm 时 AlamarBlue 对照的吸光度;*D*(R620):波长 620 nm 时 RPMI1640 对照的吸光度)。AlamarBlue 还原率越高,表明增殖细胞越多。根据 AlamarBlue 还原率绘制各组细胞的生长曲线。

1.2.9　统计学分析　　采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

## 2　结果

### 2.1　pshRNA-Hsp70 重组质粒的构建与鉴定

将设计 Hsp70 的 DNA 片段在 GenBank 中用 BLAST 进行检索,证实仅与 Hsp70 的编码基因有同源性,即有明显的特异性,可用于 shRNA 的构建。将合成退火的 Hsp70 DNA 双链与载体 pTZU6 +1 连接后,由于重组克隆 *Sal* Ⅰ 酶切位点丢失,以及用 *Eco*R Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切,阳性克隆可产生 400 bp 左右的片段,而空载体 pTZU6 +1 仅切出 350 bp 左右的片段,因此从电泳图中看到筛选的克隆用 *Eco*R Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切可产生 400 bp 左右的片段,同时又不能被 *Sal* Ⅰ 酶切开,证实此克隆为阳性克隆(按上述方法选择出 3 个重组质粒,分别是 phsp1-siRNA、phsp2-siRNA 和 phsp3-siRNA 阳性克隆菌)。见图 1。




M:标准; 1:空质粒 pTZU6 +1; 2:空质粒 pTZU6 +1 经 *Sal* Ⅰ酶切; 3:空质粒 pTZU6 +1 经 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ酶切; 4:phsp1-siRNA 质粒经 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ酶切; 5:phsp2-siRNA 质粒经 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ酶切; 6:phsp3-siRNA 质粒经 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ酶切;7:phsp1-siRNA 质粒经 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ酶切

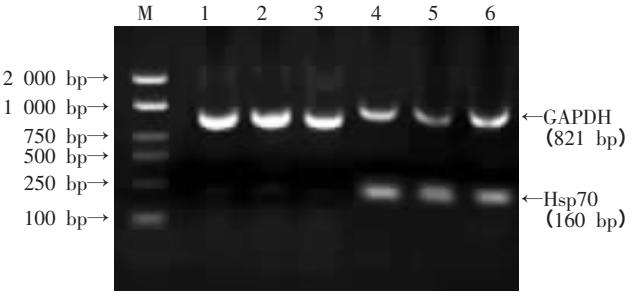
**图 1　pshRNA-Hsp70 重组质粒的筛选**

### 2.2　序列测定

结果显示测序结果与设计的 3 个 DNA 片段序列完全一致,进一步证实 Hsp70 的 shRNA 即载体 phsp-siRNA 构建成功。

### 2.3　半定量 RT-PCR 检测 Hsp70 mRNA 的表达

空白组、空质粒组和对照组(phsp3-siRNA 组)的各组 Hsp70 的 mRNA 表达无明显变化,而 phsp1-siRNA 和 phsp2-siRNA 质粒处理组 Hsp70 的 mRNA 表达明显下调(RT-PCR 产物 Hsp70,GAPDH 分别为 160、821 bp)。见图 2。

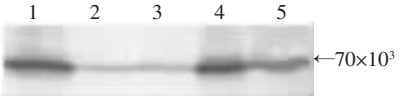



M:标准; 1:重组质粒 phsp1-siRNA; 2:重组质粒 phsp2-siRNA; 3:重组质粒 phsp1-siRNA;4:重组质粒 phsp3-siRNA;5:空质粒 pTZU6 +1; 6:空白对照

**图 2　RT-PCR 检测胃癌细胞 SGC-7901 Hsp70 mRNA 的表达**

### 2.4　Western blot 检测 Hsp70 的表达

转染 phsp1-siRNA 和 phsp2-siRNA 质粒后的 BGC-823 细胞中,Hsp70 反应条带明显减弱,即 Hsp70 蛋白表达明显被抑制。而在空白组、空质粒组和对照组(phsp3-siRNA 组)的各组 Hsp70 蛋白表达无明显变化。应用 Quantity one4.52 图像分析软件进行图像分析,以空白组的蛋白带为标准(亮度定为 100),其他几组与之比较,转染质粒 pTZU6 +1、phsp3-siRNA、phsp1-siRNA 和 phsp2-siRNA 组分别是 91.32%、89.64%、23.65% 和 38.56%。见图 3。

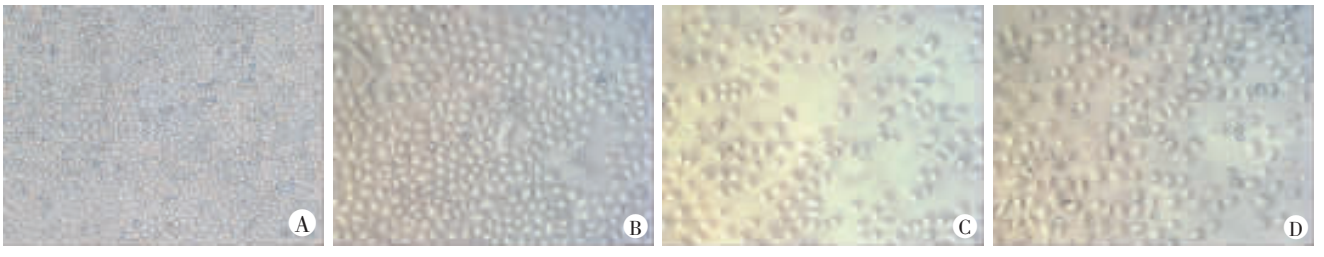



1:对照组; 2:转染 phsp1-siRNA 的细胞内 Hsp70 的表达; 3:转染 phsp2-siRNA 的细胞内 Hsp70 的表达; 4:转染 phsp3-siRNA 的细胞内 Hsp70 的表达; 5:转染 pTZu6 +1 的细胞内 Hsp70 的表达

**图 3　Western blot 检测胃癌细胞 Hsp70 的表达**

### 2.5　细胞的增殖生长情况

应用 AlamarBlue 法检测各处理组细胞生长增殖情况。图 4 结果显示:转染 pTZU6 +1 组和点突变组与对照组相比,细胞还原率降低,但相差无显著意义。转染 phsp1-siRNA 和 phsp2-siRNA 组细胞还原率与对照组相比有显著差异($P < 0.05$),表明细胞增殖速度减慢,并随作用时间的延长抑制作用更明显,呈时间依赖方式。




A: 空白对照组;B:空质粒组;C:重组质粒 phsp2-siRNA;D:重组质粒 phsp1-siRNA

**图 4　SGC-7901 细胞生长情况**　(SABC ×100)

## 3　讨论

RNAi 技术目前被广泛用于肿瘤和病毒所致疾病的研究[6]。其作用机制是通过活化的小干扰 RNA (small in terference RNA,siRNA) 靶向降解目的 mRNA,从而使目的基因表达沉默[7]。因其具有高效性和特异性,使研究者能够直接简单地探索基因的功能,因而在基因功能研究、转基因动物和基因治疗等生物医学领域中具有十分广阔的应用前景。

本研究利用 RNAi 技术,以 Hsp70“分子伴侣作用”作为研究对象,用含 RNA 聚合酶启动子Ⅲ(RNA pol Ⅲ)的转录载体 pTZU6 + 1,构建能产生发夹结构小干扰性 RNA 的重组载体,其优势在于它具有 U6 基因启动子,能精确的定位转录的开始。我们利用转录载体 pTZU6 + 1 构建了能在哺乳动物细胞中产生针对 Hsp70 的 shRNA 重组质粒 phsp-siRNA,并对其抑制 Hsp70 表达进行了研究。通过双酶切鉴定及插入基因片段序列分析,所构建的 phsp-siRNA 与实验设计的 DNA 片段序列完全一致,即成功地将目的基因片段插入到质粒预计位点。

体外实验结果表明在胃癌细胞 SGC-7901 中重组质粒 phsp1-siRNA 和 phsp2-siRNA 能明显抑制内源性 Hsp70 mRNA 转录及其蛋白的表达,与目的基因不相匹配的 phsp3-siRNA 重组质粒对 Hsp70 基因转录及其蛋白的表达几乎无变化,说明 RNAi 具有高度的特异性,同时也说明 siRNA 转录模板中碱基发生突变时,其诱导的 RNAi 基本无效,这与文献[8 - 10]报道相一致。应用 AlamarBlue 法检测发现,转染 phsp1-siRNA 和 phsp2-siRNA 组细胞还原率与对照组相比有显著性差异,对肿瘤细胞的增殖具有明显的抑制作用,这充分说明靶向 Hsp70 基因的特异性 siRNA 能够特异性抑制肿瘤细胞中 Hsp70 mRNA 转录及其蛋白的表达,从而达到抑制肿瘤生长及转移。

关于 HSP70 对肿瘤的作用机制目前还不十分清楚,大量学者认为 HSP70 是一种抗凋亡蛋白,具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用,可通过沉默 Hsp70 mRNA 转录及其蛋白的表达来达到抑制肿瘤增殖的目的[11]。但仍有少数学者认为,HSP70 在某些情况下具有促进肿瘤细胞凋亡作用。因此可以认为 HSP70 作为“分子伴侣”在调节肿瘤细胞生长和凋亡方面具有双重性[12],这为进一步研究其作用增加了一定难度。

**参考文献:**


[1] Flechtner J B, Cohane K P, Mehta S, *et al*. High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8 + T lymphocyte immune responses[J]. J Immunol, 2006, 177(2): 1017 - 1027.

[2] Li Y, Subjeck J, Yang G, *et al*. Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy[J]. Vaccine, 2006, 24(25): 5360 - 5370.

[3] Guzhova I V, Novoselov S S, Margulis B A. Hsp70 chaperone and the prospects of its application in anticancer therapy[J]. Tsitologiia, 2005, 47(3): 187 - 199.

[4] 谯　敏, 向廷秀, 赵　蕾, 等. 靶向 COX-2 基因的 RNA 干扰治疗裸鼠胃癌的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 36(4): 552 - 555, 565.

[5] 谯　敏, 向廷秀, 姜　政. 靶向 COX-2 的 RNA 干扰抑制胃癌细胞增殖及相关信号分子改变[J]. 肿瘤, 2006, 26(12): 1069 - 1073.

[6] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550 - 553.

[7] 张云汉. RNA 干扰作用的机制及其在肿瘤基因治疗中的应用前景[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(3): 393 - 395.

[8] Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, *et al*. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Sci, 2006, 97(7): 623 - 632.

[9] Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, *et al*. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2007, 21(1): 93 - 101.

[10] Rossi A, Ciafre S, Balsamo M, *et al*. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7678 - 7685.

[11] Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, *et al*. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(2): 616 - 625.

[12] Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, *et al*. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(1): 15 - 27.


(编辑　吴培红)

## 作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》,本刊实行三位分节法(即从小数点算起,向左向右每 3 位分 1 节,节间留出一定空隙),废除千分撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字,凡属计数数值,一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部