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