

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.06.008

· 基础研究 ·

## HIF-1 $\alpha$ 特异性 siRNA 对 VX2 移植瘤组织缺氧状态的调节及其抗癌效应

窦建新<sup>1</sup>, 任瑞美<sup>2\*</sup>, 李文通<sup>1</sup>, 张伟栋<sup>1</sup>, 蔡晓珊<sup>1</sup>, 刘静<sup>1</sup> (1. 潍坊医学院病理学教研室, 山东潍坊 261041; 2. 山东省肿瘤医院放疗二科, 山东济南 250117)

**[摘要]** 目的: 探讨缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 特异性 siRNA 调节肿瘤组织缺氧状态的抗肿瘤效应。方法: 构建含有 HIF-1 $\alpha$  特异性 RNAi 序列的重组腺病毒载体, 建立携带 VX2 肿瘤细胞的荷瘤模型兔。将构建好的重组腺病毒载体注入兔耳缘静脉中进行治疗, 以注入无干扰序列腺病毒载体为对照。采用正电子发射计算机断层显像 (positron emission computed tomography, PET) 成像的方法观察模型兔肿瘤组织缺氧和坏死的变化。切除剥离肿瘤, 测量肿瘤体积; H-E 染色法检测肿瘤组织坏死程度; 采用 RT-PCR 检测 HIF-1 $\alpha$  在肿瘤组织中表达的变化。结果: 成功构建携 HIF-1 $\alpha$  特异性 siRNA 的重组腺病毒, 其滴度约为  $1.1 \times 10^{10}$  PFU/ml。PET 成像检测显示, 经 siRNA 重组腺病毒治疗后的移植瘤组织中 <sup>18</sup>F-FDG 标准摄取率 (SUV) 较对照兔显著降低 [  $3.51 \pm 0.36$  ]% vs [  $8.73 \pm 0.83$  ]% ,  $P < 0.01$  ], 图像显示肿瘤组织内部出现了明显的缺氧和坏死区域。HIF-1 $\alpha$  siRNA 治疗组的移植瘤体积显著小于对照组 ( $P < 0.01$ ), 肿瘤组织坏死面积明显大于对照组 ( $P < 0.01$ ); RT-PCR 检测显示, 治疗组肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 水平显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。结论: HIF-1 $\alpha$  特异性 siRNA 使肿瘤组织 HIF-1 $\alpha$  表达减少、肿瘤组织缺氧加剧和坏死增加, 从而产生明显的抗肿瘤效应。

**[关键词]** 缺氧诱导因子; RNA 干扰; VX2 移植瘤; 基因治疗; 正电子发射计算机断层显像

**[中图分类号]** R730.54      **[文献标志码]** A      **[文章编号]** 1007-385X(2008)06-0543-05

## Anti-tumor and hypoxia regulatory effect of HIF-1 $\alpha$ specific siRNA in transplanted VX2 tumor

DOU Jian-xin<sup>1</sup>, REN Rui-mei<sup>2\*</sup>, LI Wen-tong<sup>1</sup>, ZHANG Wei-dong<sup>1</sup>, CAI Xiao-shan<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup> (1. Department of Pathology, Weifang Medical College, Weifang 261041, Shandong, China; 2. Department of Radiotherapy, Shandong Tumor Hospital, Jinan 250117, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the anti-tumor and hypoxia regulatory effect of HIF-1 $\alpha$  siRNA in tumor tissues. **Methods:** The HIF-1 $\alpha$  siRNA adenovirus vectors targeting HIF-1 $\alpha$  were constructed and the rabbit VX2 tumor model was established. The constructed vectors were injected into rabbits through ear vein; noninterference sequence was injected as control. PET (positron emission computed tomography) was used to observe the changes of hypoxia and necrosis in tumor tissues. The tumors were removed and the tumor volumes were measured. H-E staining was used to observe the degree of the necrosis; RT-PCR was used to detect the change of HIF-1 $\alpha$  expression in tumor tissues. **Results:** The recombinant HIF-1 $\alpha$  siRNA adenovirus vectors were successfully constructed, with a titre of  $1.1 \times 10^{10}$  pfu/mL. PET imaging showed that the SUV of <sup>18</sup>F-FDG was significantly decreased in HIF-1 $\alpha$  siRNA injected group than that in the control group ( [  $3.51 \pm 0.36$  ]% vs [  $8.73 \pm 0.83$  ]% ,  $P < 0.01$  ). Images showed that the tumor tissue had obvious hypoxia and necrosis. The sizes of the tumors of HIF-1 $\alpha$  siRNA injected group were significantly smaller than that of the control group ( $P < 0.01$ ); the necrosis areas in the tumors of HIF-1 $\alpha$  siRNA injected group were significantly larger than that of control group ( $P < 0.01$ ). RT-PCR demonstrated that the expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA in HIF-1 $\alpha$  siRNA injected group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** HIF-1 $\alpha$  specific siRNA can reduce HIF-1 $\alpha$  expression in tumor tissues and aggregate the hypoxia and necrosis of tumor tissue, therefore producing obvious anti-tumor effect.

**[基金项目]** 山东省科技厅博士基金项目, (No. 2006BS03035)。Supporting by the Doctoral Research Foundation from Science and Technology Commission of Shandong Province (No. 2006BS03035)

**[作者简介]** 窦建新 (1983 - ), 女, 山东省青州市人, 硕士研究生, 主要从事分子病理学研究。

\* Corresponding author, E-mail: renruimei@sina.com.cn

[ **Key words** ] hypoxia inducible factor; RNA interference; VX2 tumor; gene therapy; positron emission computed tomography

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15( 6 ): 543-547 ]

目前恶性肿瘤的非手术治疗主要是依靠放射疗法和化学疗法,但肿瘤乏氧产生的缺氧诱导因子-1 $\alpha$  ( hypoxia inducible factor- 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  )使得肿瘤细胞对放疗和某些化疗药物的效应减弱,并且使残存的肿瘤细胞更具有侵袭性和转移性,对各种疗法更具有抵抗性,这成为了恶性肿瘤治疗失败、复发和转移的重要原因之一。因此,如何降低肿瘤的乏氧,成为近年来的研究热点。

RNAi 作为一种新兴基因沉默技术被广泛地应用于生物学的许多领域,具有抑制效率高、受 mRNA 二级结构的影响较小、容易筛选靶序列等特点。本实验构建针对 *HIF-1 $\alpha$*  mRNA 的、能够表达 siRNA、感染效率高的腺病毒干扰载体,通过荷 VX2 肿瘤兔耳缘静脉注射构建好的重组腺病毒载体,采用正电子发射计算机断层显像( positron emission computed tomography, PET )成像观察肿瘤内部的乏氧和坏死的变化,通过 RT-PCR 的方法观察肿瘤细胞表达 *HIF-1 $\alpha$*  mRNA 的变化,旨在探讨调节 *HIF-1 $\alpha$*  所产生的抗肿瘤效应。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 主要实验材料

荷有肿瘤细胞 VX2 的新西兰大白兔,3 个月月龄雄性纯种新西兰大白兔 32 只,( 体质量 1.5 ~ 2.0 kg ),均购自山东省农科院( 实验动物合格证号为 sxk-鲁-2004-0013 );pAd 腺病毒载体购自美国 ATCC 公司。TRIzol<sup>®</sup> Reagent、SuperScript<sup>™</sup> one step RT-PCR with platinumTaq、Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 试剂盒购自 Invitrogen 公司;RPMI 1640、DMEM 为 Gibco 公司产品;17 $\beta$ -雌二醇、G418、MTT 均为 Sigma 公司产品。

#### 1.2 siRNA 重组腺病毒载体的构建

1.2.1 pAd- HIF-1 $\alpha$  重组腺病毒的构建 化学合成两条互补的针对兔 HIF-1 $\alpha$  mRNA ( NM 001082782 )的特异性 siRNA。合成的序列如下:5' GATCCCCGCTCTTCATACATGAATACTAGAGCGTATTCATGTATGAAGAGCTTTTGTAA3'; 5' AGCTTTCAA AAAGCTCTTCATACATGAATACGCTCTAGTATTC ATGTATGAAGAGCGGG3' 合成序列经退火形成两条双链后被克隆到 pSUPER 干扰载体,并电泳和测序鉴定。pSUPER-HIF-1 $\alpha$  经 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切后的干扰序列连接到 pAdTrack,构建成 pAdTrack-HIF-

1 $\alpha$ ,线性化的 pAdTrack-HIF-1 $\alpha$  转入含 pAdEasy-1 的感受态细菌 BJ5183 中进行重组。小量抽提转化的克隆菌质粒 DNA,选择可疑重组体腺病毒质粒 DNA,经 *Bam*H I 酶切鉴定<sup>[1]</sup>。

1.2.2 siRNA 重组腺病毒载体的包装和扩增 将 293 细胞以  $2 \times 10^6$ /孔接种于 60 mm 培养皿,细胞培养至 50% ~ 70% 融合时,分别将 4  $\mu$ g 经 *Pac* I 线性化的 pAd-HIF-1 $\alpha$  感染 293 细胞,培养 10 ~ 14 d, -80  $^{\circ}$ C/37  $^{\circ}$ C 反复冻融破碎细胞,离心,取病毒上清重新感染 293 细胞进行大量扩增,将最终收集病毒上清进行 CsCl 密度梯度超速离心纯化,并测定病毒滴度。

#### 1.3 荷瘤模型兔的建立

25% 乌拉坦 4 ml/kg 静脉麻醉荷 VX2 肿瘤兔后,用外科方法完整取出肿瘤,剔除瘤周组织及包膜,剪取肿瘤边缘部分生长旺盛的鱼肉样组织为 1 mm<sup>3</sup>大小的瘤块,将 VX2 肿瘤组织块移植于 32 只新西兰大白兔大腿外侧皮下。1 个月后肿瘤长成。实验前用游标卡尺测量肿瘤的长度和宽度,按照公式  $V = a \times b^2/2$  计算出肿瘤的近似体积( 其中 a 为肿瘤的长度,b 为肿瘤的宽度)。

#### 1.4 siRNA 重组腺病毒对荷瘤模型兔的治疗

将制备好的重组腺病毒上清按照含  $1 \times 10^9$  PFU 经耳缘静脉注入荷瘤兔血液内,注入不含干扰序列的载体作为阴性对照。1 周后采用 PET 成像的方法显示肿瘤内部的乏氧和坏死的情况。成像后切下肿瘤检测 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达的改变。

#### 1.5 PET 显像检测 HIF-1 $\alpha$ siRNA 对瘤组织摄取 <sup>18</sup>F-FDG 的影响

治疗 1 周后,将新西兰大白兔全麻,注入 7.4 kBq/ $\mu$ l 的 <sup>18</sup>F-FDG 600  $\mu$ l,并设标准源,PET 仪下显像。观察治疗前后 <sup>18</sup>F-FDG 在大白兔肿瘤组织中的浓度变化,分别测定并计算治疗前后病灶的标准摄取率( SUV ),  $SUV = \text{衰减校正后的平均感兴趣区的放射性}/\text{每克体重的放射性示踪剂的注入剂量}$ 。

#### 1.6 H-E 染色观察肿瘤组织病理学变化

造影结束后,切下肿瘤标本测量体积,每份标本分 2 ~ 3 块,经中性 10% 甲醛液固定后,切片 H-E 染色。光镜下观察肿瘤组织坏死范围,分为轻度( 0% ~ 30% )中度( 31% ~ 70% )重度( 71% ~ 100% )。

#### 1.7 RT-PCR 检测肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$ mRNA 的表达

用 Trizol 试剂盒提取肿瘤组织中的总 RNA, 逆转录合成 cDNA。RT-PCR 检测样本中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 水平。 $\beta$ -actin 基因做内对照, 上下游引物如下(表 1)。反应在 25  $\mu$ l 的体系中进行, 其中 2  $\times$  RT-PCR Buffer 12.5  $\mu$ l、10  $\mu$ mol/L 的上下游引物各 1  $\mu$ l、样本 cDNA 2  $\mu$ l (300 ng)、RNA 酶灭活水 8.5  $\mu$ l。热循环如下: 50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 15 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。

表 1 引物序列  
Tab.1 RT-PCR primer set

Primer	Sequence
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	
Upstream primer	5'-GGATATAAATTTGGCAATG-3'
Downstream primer	5'-GAGTGCAGGGTCAGCACTA-3'
<i><math>\beta</math>-actin</i>	
Upstream primer	5'-GAGCTATGAGCTGCCTGACGG-3'
Downstream primer	5'-TTGCGGTGCACGATGGAGGG-3'

1.8 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析, 所得数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 携 HIF-1 $\alpha$  特异性 siRNA 重组腺病毒的成功构建

构建的腺病毒载体采用 *Bam*H I 酶切, 由于重组后的腺病毒载体引入了一个 *Bam*H I 酶切位点, 重组腺病毒载体上含有 3 个 *Bam*H I 位点, 经酶切后, 形成 3 个片段者为阳性载体。经测定病毒滴度为  $1.1 \times 10^{10}$  PFU /L。

2.2 HIF-1 $\alpha$  siRNA 对肿瘤组织<sup>18</sup>F-FDG 摄取的影响

向荷瘤模型兔耳缘静脉中注射<sup>18</sup>F-FDG 半小时后, 进行 PET 成像。注入腺病毒干扰载体的荷瘤兔移植瘤组织中<sup>18</sup>F-FDG 的浓度明显降低。治疗前所有的病灶均显示高水平 SUV, 平均为 (6.83  $\pm$  0.56), 治疗后试验组 SUV 为 (3.51  $\pm$  0.36) 较对照组的 (8.73  $\pm$  0.83) 显著下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结果表明 HIF-1 $\alpha$  siRNA 重组腺病毒载体治疗后的肿瘤组织内部出现了明显的缺氧和坏死的区域(图 1)。

2.3 HIF-1 $\alpha$  siRNA 治疗后肿瘤体积和坏死程度的变化

治疗前肿瘤体积差异均无显著性, 治疗后 7 d, 对照组兔肿瘤体积增大明显, 治疗组肿瘤体积显著

小于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 表 2)。治疗组肿瘤大体标本呈苍白色, 界限清楚, 肿瘤切面中心可见明显坏死, 光镜检查可见肿瘤发生明显的凝固性坏死(图 2)。对照组的肿瘤坏死程度以轻度坏死为主, 治疗组以中度为主兼有部分重度坏死; 与对照组比较, 治疗组坏死所占面积比例显著增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 表 3)。

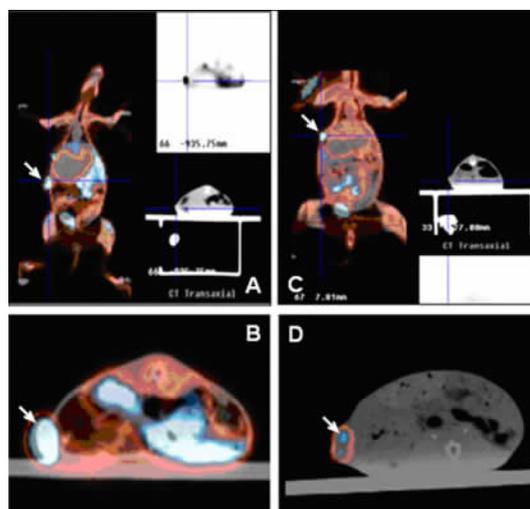


图 1 PET 成像显示 HIF-1 $\alpha$  siRNA 治疗前后肿瘤组织的缺氧和坏死区域

Fig.1 Hypoxia and necrosis areas in tumor tissue before and after treatment with HIF-1 $\alpha$  siRNA adenovirus vectors by PET

A, B: Region of the hypoxia and necrosis in the tumor tissue of the control group; C, D: Region of the hypoxia and necrosis in the tumor tissue of HIF-1 $\alpha$  siRNA group. Arrows show the regions of the hypoxia and necrosis

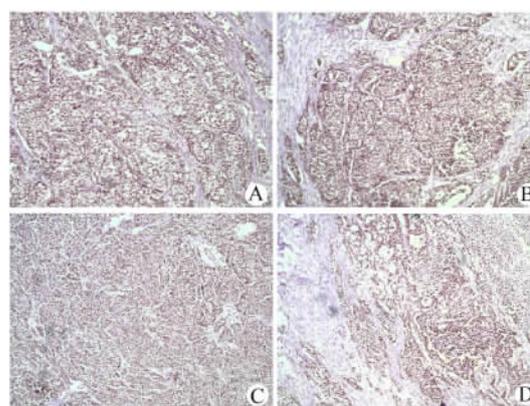


图 2 HIF-1 $\alpha$  siRNA 治疗前后肿瘤的坏死程度(H-E,  $\times 100$ )

Fig.2 Degree of tumor necrosis before and after treatment with HIF-1 $\alpha$  siRNA adenovirus vectors (H-E,  $\times 100$ )

A, C: Degree of tumor necrosis of control group before and after treatment, respectively; B, D: Degree of tumor necrosis of HIF-1 $\alpha$  siRNA group before and after treatment, respectively

表 2 *HIF-1α* siRNA 治疗后肿瘤体积的变化 ( $\bar{x} \pm s, V/mm^3$ )

**Tab. 2 Change of tumor volume after treatment with *HIF-1α* siRNA adenovirus vectors ( $\bar{x} \pm s, V/mm^3$ )**

Group	Before therapy	After therapy
Control	1 156 ± 151.5	2 636.5 ± 169.2
Therapy	1 135 ± 139.2	1 010.2 ± 152.3**

\*\*  $P < 0.01$  vs control group.

表 3 *HIF-1α* siRNA 治疗对肿瘤坏死程度的影响

**Tab. 3 Effect of *HIF-1α* siRNA treatment on necrosis of tumor tissue**

Group	N	Area of necrosis		
		≤30%	31% ~ 70%	71% ~ 100%
Control	16	16	0	0
Therapy**	16	0	12	4

\*\*  $P < 0.01$  vs control group.

2.4 *HIF-1α* siRNA 治疗后肿瘤组织 *HIF-1α* mRNA 的变化

RT-PCR 检测结果显示, 以对照组肿瘤细胞中 *HIF-1α* mRNA 与  $\beta$ -actin mRNA 的比值作为 1, 治疗组肿瘤细胞中 *HIF-1α* mRNA 的相对水平显著降低, 仅为对照组的 1/3 左右 ( $P < 0.01$ , 图 3)。

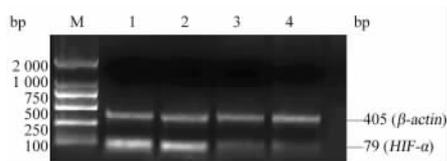


图 3 *HIF-1α* siRNA 治疗前后肿瘤组织 *HIF-1α* mRNA 的表达  
Fig. 3 Expression of *HIF-1α* mRNA in tumor tissue before and after treatment with *HIF-1α* siRNA adenovirus vectors

M: Marker DL2000; 1-2: Control group; 3-4: Therapy group

3 讨论

肿瘤内部部分细胞处于缺氧状态, 瘤体越大, 缺氧细胞所占的比例越高。缺氧引起癌细胞对化疗具有高抵抗力, 并增强了肿瘤细胞的侵袭、转移能力<sup>[2]</sup>。放疗造成肿瘤的局部缺氧, 而缺氧促进肿瘤对放疗的抵抗<sup>[3]</sup>, 如何能提高肿瘤对放射治疗的敏感性成为研究的热点。

检测缺氧的方法主要有氧电极探测<sup>[4]</sup>、组织学及闪烁显像等, 但由于有创性及技术局限性, 无法在临床常规使用。近年随着分子影像学的发展及药品

探针的开发, 应用正电子发射断层显像 (PET) 进行肿瘤乏氧显像可以全面、无创和重复地检测乏氧并指导治疗, 检测肿瘤包括转移的生化特性, 可显示肿瘤更多新陈代谢的病理生理特性, 有助于探讨其基因组、蛋白组和肿瘤的氧合状态, 而且还可以使人们从分子水平无创伤性的定量及动态观察到代谢物或药物在人体内的生理生化变化<sup>[5-6]</sup>。

*HIF-1* 与启动子或增强子序列中的缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 结合后可以上调多种基因表达, 如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及受体、糖酵解酶、多药耐药基因等, 促进肿瘤的血管形成和细胞增殖<sup>[7-9]</sup>, 使肿瘤细胞更具有侵袭和对放化疗的抵抗能力。因此利用 *HIF-1* 靶向治疗和其他干扰 *HIF-1* 功能的措施不仅可以杀伤肿瘤细胞, 还能够抑制肿瘤增殖和血管的形成。目前已经有多种针对 *HIF-1α* 的治疗方法, 均取得了一定的效果<sup>[10]</sup>。Takahashi 等<sup>[11]</sup>对 *HIF-1α* 进行特异性的 RNAi 后, *HIF-1α* 表达量下降, 从而抑制了肝癌细胞的生长。Krishnamachary 等<sup>[12]</sup>利用 *HIF-1α* 特异性的 siRNA 抑制人结肠癌细胞 HCT116 侵袭转移相关基因表达, 降低由乏氧或 *HIF-1α* 过表达引起的肿瘤细胞侵袭转移能力增强。本课题组<sup>[13]</sup>也曾构建干扰 *HIF-1α* 质粒 pSUPER-*HIF-1α*, 并观察它对入肺腺癌细胞 SPCA-1 摄取<sup>18</sup>F-FDG 的影响, 发现在乏氧状态下 RNA 干扰 *HIF-1α* 明显降低 SPCA-1 细胞对<sup>18</sup>F-FDG 的摄取。

本实验首先建立了携带 *HIF-1α* 特异性 siRNA 重组腺病毒载体, 将构建好的腺病毒载体通过静脉注射到荷有 VX2 肿瘤的新西兰大白兔中, 通过 PET 显影的方法观察肿瘤内部乏氧和坏死的变化。注射干扰腺病毒载体 7 d 后, 与对照组相比, PET 显示治疗组肿瘤最大直径明显减小, 肿瘤内部的光密度显著减少, 肿瘤内部出现较大面积的坏死, 减少了对造影剂的摄取。造影结束后, 切下肿瘤, 治疗组肿瘤的体积显著小于对照组。多处取材石蜡切片, H-E 染色光镜下观察治疗后坏死灶的面积占肿瘤总面积的比例显著大于对照组, RT-PCR 结果显示治疗组中的 *HIF-1α* mRNA 的水平明显降低。

腺病毒加载的 RNAi 能通过降低肿瘤组织中的 *HIF-1α* 的表达, 减缓肿瘤生长速度, 同时促进肿瘤内部的坏死, 本实验为采用 RNAi 的方法治疗肿瘤乏氧提供依据; 通过 PET 显示的坏死面积与解剖后测出的坏死面积相符, PET 显像的方法能比较好地显示出肿瘤中坏死的面积, 本实验也为使用 PET 显像检测肿瘤乏氧状态和坏死程度提供了依据。

关于肿瘤缺氧坏死的 PET 显像技术已初步开展,由于其用于检测缺氧具备全面性、无创性及可重复性等优点,非常适合临床应用。最常用的<sup>18</sup>F-FDG PET 对多种恶性肿瘤的应用价值已得到肯定,但在临床大范围应用<sup>18</sup>F-FDG 的同时,也显示了它的局限性,部分肿瘤对<sup>18</sup>F-FDG 的低摄取造成假阴性等问题。为了克服<sup>18</sup>F-FDG 的局限性,临床开始应用其他药物。其中,<sup>18</sup>F-FMISO 作为一种能反映癌细胞缺氧程度的显像剂有广泛的应用前景,其在缺氧显像中的效果还需要通过进一步实验验证。

[ 参考文献 ]

[ 1 ] He TC, Zhou S, da Costa LT, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95( 5 ): 2509-2514.  
 [ 2 ] Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, *et al.* Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105( 17 ): 6392-6397.  
 [ 3 ] Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, *et al.* Prognostic impact of HIF-1 alpha expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer [ J ]. Strahlenther Onkol, 2008, 184( 3 ): 169-174.  
 [ 4 ] Menon C, Fraker DL. Tumor oxygenation status as a prognostic marker [ J ]. Cancer Lett, 2005, 221( 2 ): 225-235.  
 [ 5 ] Jain D, Zaret BL. Nuclear imaging techniques for the assessment of myocardial viability [ J ]. Cardiol Clin, 1995, 13( 1 ): 43-57.  
 [ 6 ] Busk M, Horsman MR, Kristjansen PE, *et al.* Aerobic glycolysis

in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia [ J ]. Int J Cancer, 2008, 122( 12 ): 2726-2734.  
 [ 7 ] Maxwell PH. The HIF pathway in cancer [ J ]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16( 4-5 ): 523-530.  
 [ 8 ] Brennan PA, Mackenzie N, Quintero M. Hypoxia-inducible factor 1alpha in oral cancer [ J ]. J Oral Pathol Med, 2005, 34( 7 ): 385-389.  
 [ 9 ] 吴欣爱,孙 燕,樊青霞,等. siRNA 沉默 HIF-1 $\alpha$  在缺氧状态下对食管鳞癌细胞 VEGF 表达的影响[ J ]. 肿瘤防治研究, 2007, 34( 10 ): 743-747.  
 [ 10 ] Chen C, Sun J, Liu G, *et al.* Effect of small interference RNA targeting HIF-1 alpha mediated by rAAV combined L: -ascorbate on pancreatic tumors in athymic mice [ J ]. Pathol Oncol Res, [ 2008-05-29 ]. [ Epub ahead of print ].  
 [ 11 ] Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1 alpha expression in tumor cells and hepatocytes [ J ]. Gene Ther, 2008, 15( 8 ): 572-582.  
 [ 12 ] Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, *et al.* Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1 [ J ]. Cancer Res, 2003, 63( 5 ): 1138-1143.  
 [ 13 ] 任瑞美,于金明,李文通,等. RNA 干扰 HIF-1 $\alpha$  对人肺腺癌细胞 SPC-A-1 摄取<sup>18</sup>F-FDG 的影响[ J ]. 中华核医学杂志, 2005, 25( 3 ): 161-163.

[ 收稿日期 ] 2008 - 08 - 24 [ 修回日期 ] 2008 - 10 - 26  
 [ 本文编辑 ] 王 莹

· 科技动态 ·

miRNA 能够在细胞周期的调控中上调靶 mRNA 的翻译

AU-rich element( AU 富集元件, ARE )是在快速反应性基因中广泛存在的一类转录后调控元件,对 mRNA 的稳定及其翻译效率起到重要的调控作用。miRNA 是一类长度为 19 ~ 23 bp 的小 RNA, 研究发现其在生命活动的各个环节都发挥着重要的转录后调控作用,通过种子序列的识别作用介导靶 mRNA 的降解或翻译的抑制。美国哈佛医学研究所分子生物物理与生物化学研究小组在研究 ARE 的调控作用中发现了 miRNA 有活化翻译的作用。

Joan A. Steitz 等发现,在细胞周期停滞的情况下,识别 TNF $\alpha$  mRNA 中 ARE 的 miRNA369-3 能够上调或活化 mRNA 的翻译。这种翻译的活化是通过 RISC 作用复合体中的 FXR1、AGO2 实现的。通过构建其他 3'UTR 的报告基因,发现其他几个 miRNAs 同样在细胞周期抑制的情况下活化基因的翻译,它们有: let-7 能够活化含有 HMGA2 3'UTR 报告基因的翻译,人工合成的 miRxcxr4 同样能够活化 3'UTR 含有其识别位点的报告基因的翻译。而在血清饥饿再加血清诱导细胞周期同步化后,这些 miRNAs 则表现出对靶基因的强烈的翻译抑制作用。在诱导细胞周期停滞上,研究人员主要采用了 hela 细胞、293 细胞血清饥饿的诱导方式,还采用了 NIH3T3 接触抑制和药物细胞周期阻滞的方法进行互补论证,都得到了相同的现象和结论。进一步研究机制发现,在这样一个翻译的活化中,miRNA 只是起到一个靶向识别的作用,使 RISC 复合体中的 AGO2 和 FXR1 募集到靶 mRNA 上,从而发挥翻译活化的作用。AGO2 在翻译的活化和翻译的制止中都发挥作用,且其 prp 和 paz 结构域都是必需的;而 FXR1 只在翻译的活化中发挥作用,不参与翻译的抑制。研究人员还用 S1 RNA tag 的方法,在细胞生理状态下,证明了在翻译活化的情况下 miRNA369-3、FXR1、AGO2 确实是与 ARE 相结合的。该研究拓展了人们对 miRNA 功能的认识,打破了传统地认为 miRNA 只能发挥抑制作用的观点,说明了在不同的细胞状态下和不同生理病理环境下同一 miRNA 可能有不同的调节作用。或许人们应当这样认为,miRNA 在发挥功能中可能只是起到靶向识别的作用,而发挥何种功能则是由其相应结合的蛋白决定的。

[ 王 品 摘译,安华章 审阅. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Science, 2007, 318( 5858 ): 1931-1934. ]