

HSP27 特异性 shRNA 表达载体的构建及在耐吉西他滨人胰腺癌细胞株 SW1990/Gem 中的表达 *

张 松 陈 敏 黄淑玲 许春红 王 军 徐桂芳 邹晓平[△]

(南京大学医学院附属鼓楼医院消化科 江苏 南京 210008)

摘要 目的: 构建 HSP27 基因的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 真核表达载体及观察其在耐吉西他滨人胰腺癌细胞株 SW1990/Gem 中的表达,为进一步探索肿瘤的基因治疗打下前期基础。**方法** 参考文献及 shRNA 设计原则,设计并合成 2 条能转录 shRNA 的 DNA 序列,退火连接后,插入含绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 基因和 U6 启动子的真核表达载体 pRNAT-U6.3 中,构建重组载体 pRNAT-shHSP27。重组载体经鉴定后转染 SW1990/Gem,倒置荧光显微镜观察转染情况,RT-PCR、Western Blot 从 mRNA 及蛋白水平探讨转染对耐吉西他滨人胰腺癌细胞株 SW1990/Gem 的影响。**结果:** 成功构建了针对 HSP27 基因的 shRNA 表达载体。倒置荧光显微镜下显示转染 48h 后 SW1990/Gem 细胞内存在 GFP 表达。RT-PCR、Western Blot 结果提示转染后 HSP27 的 mRNA 及蛋白表达水平较对照组有明显抑制 ($P < 0.05$)。**结论:** 成功构建针对 HSP27 基因的特异性 shRNA 真核表达载体,转染细胞后可抑制 HSP27 表达,为进一步研究 HSP27 与胰腺癌生物学行为及化疗耐药等相关性奠定了基础。

关键词 HSP27; shRNA; SW1990/Gem 胰腺癌 载体构建

中图分类号 R735.9 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)10-1812-05

Construction of shRNA Expression Vector Targeting the HSP27 Gene and their Expression in Human Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cell Line*

ZHANG Song, CHEN Min, HUANG Shu-ling, XU Chun-hong, WANG Jun, XU Gui-fang, ZOU Xiao-ping[△]

(Department of Gastroenterology, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu Province, 210008, China)

ABSTRACT Objective: To construct eukaryotic expression vectors of small hairpin RNA (shRNA) for HSP27 gene and investigate their expression in human gemcitabine-resistant pancreatic cells (SW1990/Gem). **Methods:** One pair of HSP27 shRNA sequence was selected and ligated to the pRNAT-U6.3 vector contained GFP gene and U6 promoter. pRNAT-shHSP27 or empty vector was introduced into SW1990/Gem cells by liposome-mediated transfection respectively. The transfected SW1990/Gem cells were then confirmed by fluoroscopy. The expression of HSP27 mRNA and protein was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. **Results:** Restriction enzyme digestion and sequence analysis showed that recombinant pRNAT-shHSP27 shRNA vector was successfully constructed. The expression of GFP was observed in transfected SW1990/Gem Cells by fluorescent microscopy. The expression levels of HSP27 mRNA and protein in SW1990/Gem cells transfected with pRNAT-shHSP27 shRNA vector were significantly lower than those in SW1990/Gem cells transfected with empty or negative vector. **Conclusion:** Recombinant pRNAT-shHSP27 shRNA vector was successfully constructed. Its transfection can silence the expression of HSP27 gene in SW1990/Gem cells. The pRNAT-shHSP27 shRNA vector lay a foundation for further study of the role of the HSP27 gene in the pathogenesis of pancreatic cancer.

Key words: HSP27; RNAi; shRNA; SW1990/Gem cell line; Pancreatic cancer; Vector construction

Chinese Library Classification(CLC): R735.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1812-05

前言

胰腺癌是一种恶性程度极高,预后极差的恶性肿瘤。近年来发病率和死亡率均有增加趋势,在西方发达国家,胰腺癌在恶性肿瘤死亡原因的排名已从第 5 位上升到第 4 位^[1]。因其早

期症状隐匿、缺乏特异表现及筛查指标,往往诊断时已是晚期,仅有 15% 的病人适合手术,大部分病人需要化疗等辅助治疗延长生存期^[2]。吉西他滨 (2',2'-二氟脱氧胞苷)(gemcitabine, 2',2'-difluoro-2'deoxyctidine, dFdC) 属于新一代阿糖胞苷类似物,于 1996 年被美国食品与药品监督管理局(FDA)批准为抗胰

* 基金项目 南京市青年科技人才启动项目 (QYK11166),中央高校基本科研业务费 (1117021408),

南京市卫生青年人才工程第三层次 (13)

作者简介 张松 (1986),男,硕士研究生,主要研究方向 HSP27 与胰腺癌化疗耐药相关性及其机制

[△]通讯作者 邹晓平,电话:13770771661, E-mail: zouxiaoping795@hotmail.com

(收稿日期 2011-12-09 接受日期 2012-01-03)

腺癌一线药物,可通过抑制肿瘤细胞 DNA 合成和诱导凋亡^[3]等途径改善患者症状、延长患者中位生存期并使患者受益^[4]。然而,吉西他滨的耐药问题很大程度上限制了其临床应用,成为吉西他滨临床应用的瓶颈。预测患者对化疗药物的敏感性以及实现个体化治疗已成为改善胰腺癌预后的关键。热休克蛋白(Heat shock proteins, HSP)是首次在高热及物理、化学等因素诱导下发现的一类蛋白质,广泛存在于原核和真核生物中,其作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、装配和修饰,增强细胞对应激的耐受性^[5]。根据分子量可分为大分子热休克蛋白(如 HSP90 和 HSP70)和小分子热休克蛋白(包括 HSP27)^[6]。HSP27 发挥分子伴侣作用的同时,与肿瘤及凋亡抑制的关系也备受关注^[7]。目前,多项研究已证实 HSP27 在胃、肝、胰腺、结直肠等多种肿瘤中较正常组织异常高表达^[8-11],并且, HSP27 的高表达与多种肿瘤的转移、肿瘤免疫、化疗耐药及不良预后等相关^[12-15]。而 HSP27 与胰腺癌生物学行为及吉西他滨化疗耐药的相关性及其机制研究鲜有报道。本实验拟构建针对 HSP27 基因的特异性 shRNA 真核表达载体,为今后研究 HSP27 对胰腺癌生物学行为的影响及与吉西他滨化疗耐药的相关性夯实基础。

1 材料和方法

1.1 细胞株、质粒和主要试剂

耐吉西他滨人胰腺癌细胞株 SW1990/Gem 为本实验室保存。携带绿色荧光蛋白(GFP)和 U6 增强启动子干扰载体 pRNAT-U6.3/Hygro 由鼓楼医院生殖中心惠赠。胎牛血清、DMEM 高糖培养基、0.25%含乙二胺四乙酸(EDTA)胰蛋白酶购于 GIBCO 公司。Tubulin 兔源性单克隆抗体(Bioworld 公司)、HSP27 兔源性单克隆抗体(Bioworld 公司)以及增强化学发光(ECL)显色试剂盒(Santa Cruz 公司)。BamH I、Hind III、EcoR I 内切酶和 T4 DNA 连接酶(Takara 公司)。DH5 α 感受态细胞(Trans 公司)以及 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 的设计 参考文献,得到 HSP27 特异性干扰序列(5'-ATCCGATGAGACTGCCGCCAA-3')^[16],同时设计阴性对照序列(5'-TACGGAAGCTGCATCCGACAC-3'),并根据 shRNA 设计原则,设计针对 HSP27 的两条 DNA 单链,单链的正义链和反义链之间为一段茎环(loop)结构,正义链 5'端加 BamH I 酶切位点,并在反义链 5'端加 Hind III 酶切位点,本文引物均由上海生工公司合成。

1.2.2 退火 取上述 DNA 片段各 1nmol 于退火缓冲液中,置于 95℃的水浴 5min,并将离心管置于 1 升 95℃的水中,缓慢冷却至室温。

1.2.3 pRNAT-U6.3/Hygro 的双酶切 取 1 μ l pRNAT-U6.3/Hygro,置于酶切缓冲液(3 μ l 10 $\times$ K buffer, 24 μ l ddH₂O, 1 μ l BamH I, 1 μ l Hind III) 37℃酶切 2h,琼脂糖凝胶电泳并切胶纯化双酶切后的 pRNAT-U6.3/Hygro 载体。

1.2.4 连接 取线性化 pRNAT-U6.3/Hygro 载体和退火片段各 5 μ l, 2 μ l 10 $\times$ DNA 连接 buffer, 7 μ l ddH₂O,在 1 μ l T4DNA 连接酶的作用下,16℃过夜连接。将 HSP27 干扰载体命名为 pRNAT-shHSP27,阴性对照组命名为 pRNAT-shControl。

1.2.5 重组载体的转化和筛选 将上述连接产物转入 DH5 α 感

受态细胞中,分别取含转化子的菌液及普通大肠杆菌 DH5 α 菌液 200 μ l,均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃孵箱培养过夜。

1.2.6 重组载体的鉴定及测序 挑取单克隆菌落,接种于含氨苄青霉素钠的 LB 培养液中振荡过夜,收集菌液 1.5ml 并提取质粒,使用 EcoR I 进行酶切,酶切产物行 1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。并对 pRNAT-U6.3/Hygro、pRNAT-shControl、pRNAT-shHSP27 采用 pRNAT-U6.3/Hygro 通用引物测序(由华大基因生物有限公司完成)。

1.2.7 细胞培养和转染 取对数生长期耐吉西他滨人胰腺癌细胞株 SW1990/Gem 接种于六孔板内,于含 10%标准胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。将 SW1990/Gem 分为 SW1990/Gem mock、SW1990/Gem shRNA (-)、shRNA (+),分别转染 pRNAT-U6.3/Hygro、pRNAT-shControl 和 pRNAT-shHSP27。转染 48 小时后使用荧光显微镜观察。

1.2.8 RT-PCR 检测基因表达情况 收集耐吉西他滨人胰腺癌细胞株 SW1990/Gem 及 SW1990/Gem shRNA (-)、shRNA (+) 细胞株,在转染 48h 后按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,反转录得到 cDNA,使用 HSP27 特异性 PCR 引物(上游 5'-CAAG-GATGGCGTGGTGA-3';下游 5'-TCTCGTTGGACTGCGTGGC-3')扩增 HSP27 基因,PCR 扩增条件 94℃预变性 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min,共 29 个循环,末次循环后 72℃ 延伸 5 min。扩增片段为 197bp。同时使用特异 PCR 引物(上游引物 5'-GCCCTCGCTGTCCACCTTCCA-3';下游引物 5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3')扩增管家基因 β -actin 作为内参对照,程序同前,基因片段为 253kb。

1.2.9 Western Blot 分析 上述三组细胞在转染 48 小时后收集细胞,裂解并提取细胞总蛋白,30 μ g 蛋白加入 5 $\times$ 上样缓冲液,95℃变性 5min,经 SDS-PAGE 电泳分离,转移至硝酸纤维素膜上,加入兔抗人 Tubulin、HSP27 一抗以及相应二抗,ECL 显色,经 X 线片曝光、显影、定影,图像经凝胶成像分析软件(Quantity one)行灰度值分析。

1.2.10 统计学分析 应用 SPASS 12.0 统计软件,所得数据用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组载体的酶切鉴定及测序分析

根据 pRNAT-U6.3/Hygro 载体图谱(SD1561),在第 491 及 3555 碱基位点均有 EcoR I 酶切位点,为了便于鉴定,在设计 shRNA 的双链 DNA 时也同时加入了一个 EcoR I 酶切位点,位于 pRNAT-shHSP27 第 888 碱基位点上(如图 1)。因此,理论上 EcoR I 酶切 pRNAT-shHSP27 后可得到三条基因条带,而酶切空载体 pRNAT-U6.3/Hygro 仅能得到两条。正如理论推测,使用 EcoR I 酶切重组载体,酶切产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,经 GoldView 染色后在紫外灯下观察,可见酶切后均可得到三条分别约 3954、2667、403bp 的基因条带,而空载体仅得到两条分别约 3954、3064bp 的基因条带(图 2),提示酶切图谱初步验证正确,且进一步测序证实无移码改变(图 3),提示重组质粒构建成功。

2.2 转染细胞株在倒置荧光显微镜下观察

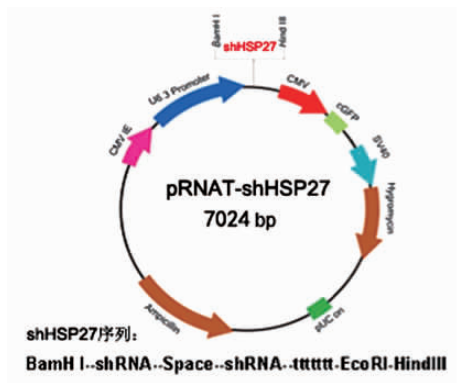


图1 重组载体 pRNAT-shHSP27 结构示意图

Fig.1 The construction of pRNAT-shHSP27 vector

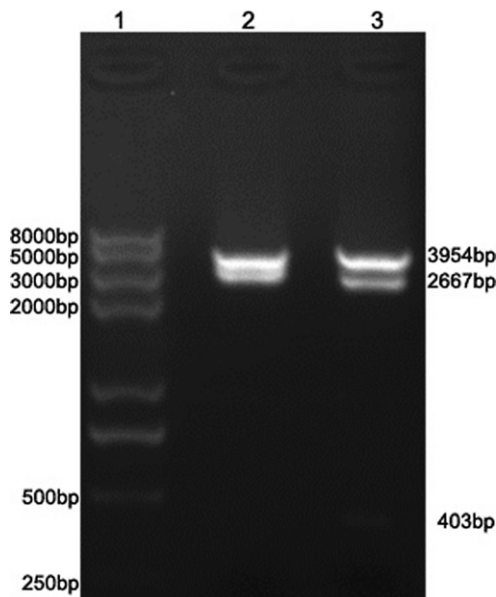


图2 pRNAT-U6.3/Hygro 及 pRNAT-shHSP27 酶切鉴定

Fig.2 The restriction enzyme digestion of pRNAT-U6.3/Hygro or pRNAT-shHSP27 :1:Marker(Trans 2K);2:pRNAT-U6.3/Hygro linearized with EcoRI;3:pRNAT-shHSP27 linearized with EcoRI

由于 pRNAT-U6.3/Hygro 质粒带有绿色荧光报告基因,将分别转染 pRNAT-U6.3/Hygro、pRNAT-shControl 及 pRNAT-sh

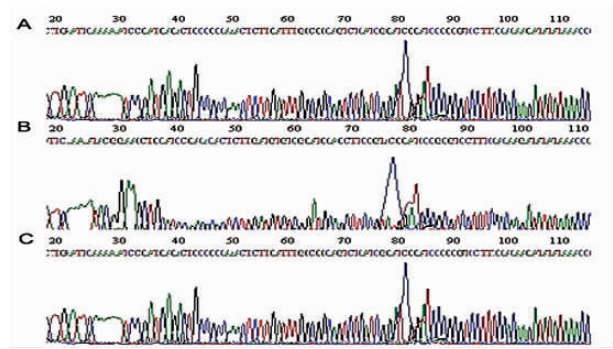


图3 pRNAT-U6.3/Hygro、pRNAT-shControl 及 pRNAT-shHSP27 测序结果

Fig.3 Identification of pRNAT-U6.3/Hygro, pRNAT-shControl or pRNAT-shHSP27 by DNA sequencing: A: pRNAT-U6.3/Hygro; B: pRNAT-shControl;C:pRNAT-shHSP27

HSP27 的 SW1990/Gem 细胞株置于倒置荧光显微镜下观察,可见转染后的三组细胞株均有绿色荧光表达,如图 4 所示。而未转染细胞株无荧光表达。

2.3 RT-PCR 法检测 HSP27 mRNA 的表达

RT-PCR 法检测细胞株 SW1990/Gem、SW1990/Gem shRNA (-) 及 SW1990/Gem shRNA (+) 的 HSP27 mRNA 表达水平,结果表明三种细胞株于 197kb 位置均可见 HSP27 基因特异性条带(图 5),SW1990/Gem shRNA (-) 细胞株 HSP27 基因相对光密度值为 0.573 ± 0.041 ,SW1990/Gem 及 SW1990/Gem shRNA (-) 细胞株分别为 0.947 ± 0.090 和 0.868 ± 0.038 ,提示 SW1990/Gem shRNA (+) 细胞株 HSP27 mRNA 表达水平较 SW1990 及 SW1990/C1 明显降低,且差异有统计学意义(图 6, $*P < 0.05$)。

2.4 Western Blot 检测 HSP27 蛋白表达情况

利用 Western Blotting 技术对各组细胞株的 HSP27 蛋白表达水平进行检测,如图 7、8 所示,pRNAT-shHSP27 转染 SW1990/Gem 48h 后,其 HSP27 蛋白表达水平明显降低,相对光密度值为 0.881 ± 0.046 。而未转染、转染阴性对照组 HSP27 蛋白表达相对光密度值分别为 1.447 ± 0.064 和 1.393 ± 0.102 ,与转染 pRNAT-shHSP27 组比较均有统计学差异 ($^{\wedge}P < 0.05$)。

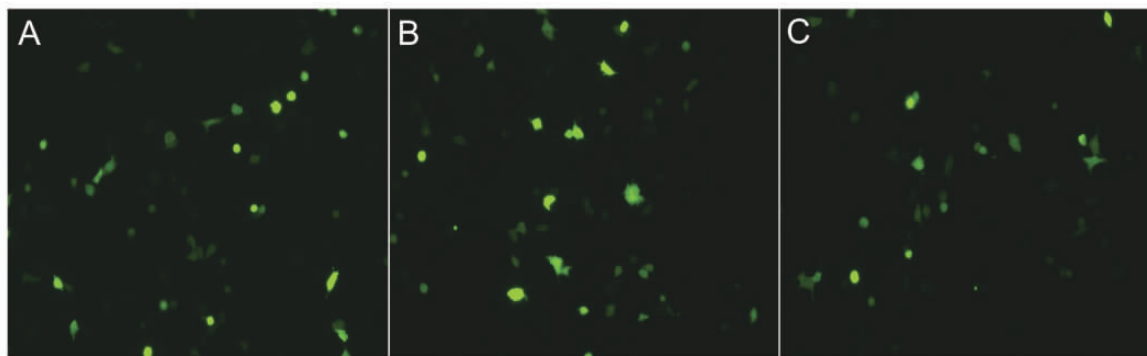


图4 pRNAT-U6.3/Hygro、pRNAT-shControl 及 pRNAT-shHSP27 转染 SW1990/Gem 的荧光显微照片($\times 200$)

Fig.4 SW1990/Gem transfected by pRNAT-U6.3/Hygro,pRNAT-shControl or pRNAT-shHSP27 was visualized by fluorescence microscopy ($\times 200$):

A:SW1990/Gem mock;B:SW1990/Gem shRNA (-);C:SW1990/Gem shRNA (+)

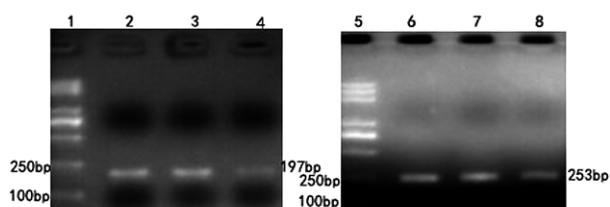


图 5 RT-PCR 检测 SW1990/Gem, SW1990/Gem shRNA (-) 及 SW1990/Gem shRNA (+) HSP27 mRNA 表达水平

Fig. 5 The expression of HSP27 mRNA of SW1990/Gem, SW1990/Gem shRNA (-) or SW1990/Gem shRNA (+): 1,5: Marker(Trans 2K); 2:HSP27 mRNA of SW1990/Gem; 3: HSP27 mRNA of SW1990/Gem shRNA (-); 4:HSP27 mRNA of SW1990/Gem shRNA (+); 6: β-actin mRNA of SW1990/Gem; 7: β-actin mRNA of SW1990/Gem shRNA (-); 8: β-actin mRNA of SW1990/Gem shRNA (+)

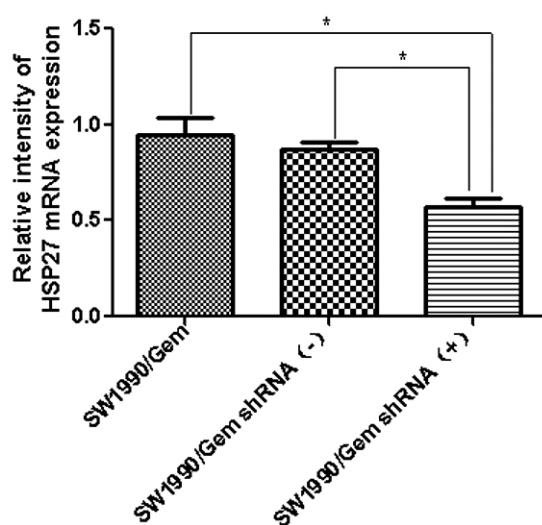


图 6 SW1990/Gem, SW1990/Gem shRNA (-) 及 SW1990/Gem shRNA (+) HSP27 mRNA 相对光密度值比较

Fig.6 The relative intensity of HSP27 mRNA expression of SW1990/Gem, SW1990/Gem shRNA (-) or SW1990/Gem shRNA (+)

Note: *P<0.05 注: ^P≤ 0.01

3 讨论

HSP27 在生物体内存在构成型和诱导型两种形式,生理状态下机体表达的为构成型 HSP27,参与调控细胞的增殖、分化以及神经系统的发育等生理过程。而在高温、紫外线、药物等刺激时,机体表达的是诱导型 HSP27,其通过调节细胞死亡的关键信号通路、减少活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)形成等多种方式发挥细胞保护作用^[17]。HSP27 的功能可通过翻译后修饰如磷酸化来调控,其 15、78、82 位的丝氨酸是磷酸化的主要位点^[6]。已有研究提示 HSP27 的磷酸化可能与胰腺癌吉西他滨化疗敏感性有关^[18],但其作用仍存争议。随着 HSP27 与肿瘤耐药的关系得到不断地关注, Garrido 及 MASASHI 等证实了 HSP27 的高表达与结直肠癌的阿霉素耐药和 5-氟尿嘧啶耐药明确相关,敲低 HSP27 的表达可起到增敏作用^[19,20]。HSP27 也是引起胃癌细胞株长春新碱及阿霉素耐药的重要因素,抑制耐药细胞株的 HSP27 表达,可增强其对阿霉素和长春新碱的

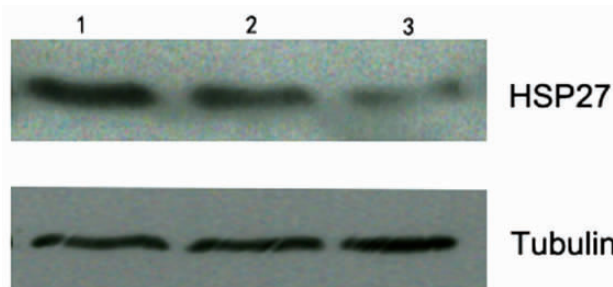


图 7 Western Blot 分析转染 pRNAT-shHSP27 对 SW1990/Gem 细胞株的影响

Fig. 7 The HSP27 protein expression in SW1990/Gem transfected with pRNAT-shHSP27

1:SW1990/Gem; 2:SW1990/Gem shRNA (-); 3:SW1990/Gem shRNA (+)

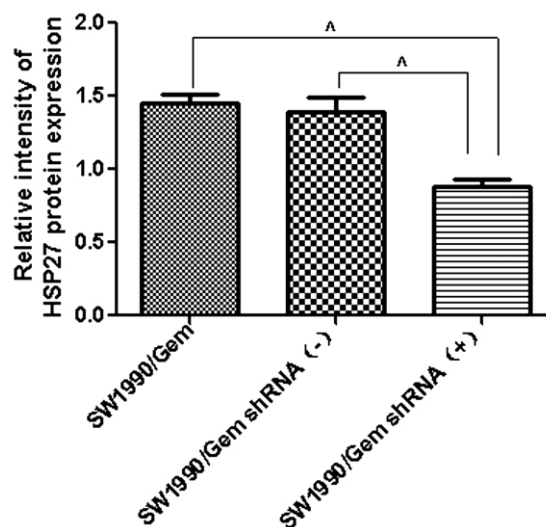


图 8 SW1990/Gem, SW1990/Gem shRNA (-) 或 SW1990/Gem shRNA (+) 的 HSP27 蛋白相对灰度值比较

Fig.8 The relative intensity of HSP27 protein expression of SW1990/Gem, SW1990/Gem shRNA (-) or SW1990/Gem shRNA (+)

Note: ^P<0.05 注: ^P≤ 0.01

敏感性^[14,21]。在膀胱癌中, HSP27 的作用同样举足轻重, Masayuki 等用第二代反义寡核苷酸 OGX427 和 siRNA 抑制 HSP27 表达后膀胱癌细胞对紫杉醇的敏感性增加^[22]。近期 HSP27 与胰腺癌的关系引起国内外广泛重视, MORI-IWAMOTO 等通过对比吉西他滨敏感胰腺癌细胞株 (KLM1) 和耐药株 (KLM1-R) 的蛋白组学特点,证实耐药株 (KLM1-R) 中 HSP27 存在高表达, siRNA 敲低耐药株 (KLM1-R) HSP27 的表达可使其恢复对吉西他滨的敏感性,提示 HSP27 可能与胰腺癌吉西他滨耐药相关, HSP27 有望成为判断胰腺癌对吉西他滨敏感性的有效指标^[23]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是近年来发展起来的一种基因阻断技术,具有抑制作用强、稳定性高、细胞摄取相对容易等优点^[24,25]。细胞内的双链 RNA (dsRNA) 可被 Dicer 酶识别并剪切,产生 21-23nt 大小的 siRNAs (small interfering RNAs)。siRNA 分子被整合进 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中,通过碱基互补配对

识别具同源序列的 mRNA,并介导其降解,进而实现靶基因的沉默^[26]。本实验通过构建 shRNA 表达载体来实现对目的基因的沉默。目前研究表明具有发夹结构的 siRNA 更接近生理 RNAi 现象的自然机制,并能有效发挥阻断基因表达的作用^[27]。2002 年 Brummelkamp 等^[28]将 siRNA 所对应的模板 DNA 序列克隆入真核载体并转染细胞,转录得到的 shRNA 与 siRNA 具有相同基因封闭的作用但作用时间可持续两个月左右。该技术与传统基因沉默技术相比,具有效果强、持续时间长、技术流程简便以及在细胞内表达稳定、高效和可传递性等优势,已经在肿瘤的基因治疗方面显示出诱人的前景^[29,30]。本实验利用基因重组技术,构建了 HSP27 的 shRNA 特异性干扰载体,通过脂质体转染耐吉西他滨人胰腺癌细胞株 SW1990/Gem 并实现敲低 HSP27 蛋白表达的目的。为进一步探讨 HSP27 基因与胰腺癌生物学行为及化疗耐药等相关性奠定了重要基础,也为胰腺癌基因治疗的临床应用开辟新的思路。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 60(5): 277-300
- [2] Cress RD, Yin D, Clarke L, et al. Survival among patients with adenocarcinoma of the pancreas: a population-based study (United States)[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 403-409
- [3] Plunkett W, Huang P, Searcy CE, et al. Gemcitabine: preclinical pharmacology and mechanisms of action [J]. Semin Oncol, 1996, 23(5): 3-15
- [4] Abrams RA. Adjuvant therapy for pancreatic adenocarcinoma [J]. J Gastrointest Surg, 2001, 5(1): 6-7
- [5] Lindquist S and Craig EA. The heat-shock proteins [J]. Annu Rev Genet, 1988, 22: 631-677
- [6] Garrido C, Brunet M, Didelot C, et al. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties [J]. Cell Cycle, 2006, 5(22): 2592-2601
- [7] Parcellier A, Schmitt E, Brunet M, et al. Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(3-4): 404-413
- [8] Huang Q, Ye J, Huang Q, et al. Heat shock protein 27 is over-expressed in tumor tissues and increased in sera of patients with gastric adenocarcinoma[J]. Clin Chem Lab Med, 48(2): 263-269
- [9] King KL, Li AF, Chau GY, et al. Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival[J]. Cancer, 2000, 88(11): 2464-2470
- [10] Melle C, Ernst G, Escher N, et al. Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker[J]. Clin Chem, 2007, 53(4): 629-635
- [11] Pei H, Zhu H, Zeng S, et al. Proteome analysis and tissue microarray for profiling protein markers associated with lymph node metastasis in colorectal cancer[J]. J Proteome Res, 2007, 6(7): 2495-2501
- [12] Kurahashi T, Miyake H, Hara I, et al. Expression of major heat shock proteins in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy [J]. J Urol, 2007, 177(2): 757-761
- [13] Kapranos N, Kominea A, Konstantinopoulos PA, et al. Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002, 128(8): 426-432
- [14] Yang YX, Sun XF, Cheng AL, et al. Increased expression of HSP27 linked to vincristine resistance in human gastric cancer cell line [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(2): 181-189
- [15] Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, et al. HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2004, 25(2): 165-168
- [16] O'Callaghan SC, Gabai VL, Sherman MY. Hsp27 modulates p53 signaling and suppresses cellular senescence [J]. Cancer Res, 2007, 67(24): 11779-11788
- [17] 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
- [18] Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, et al. Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells [J]. Anticancer Res, 30(7): 2539-2543
- [19] Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, et al. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27[J]. Eur J Biochem, 1996, 237(3): 653-659
- [20] Tsuruta M, Nishibori H, Hasegawa H, et al. Heat shock protein 27, a novel regulator of 5-fluorouracil resistance in colon cancer [J]. Oncol Rep, 2008, 20(5): 116511-116572
- [21] Yang YX, Xiao ZQ, Chen ZC, et al. Proteome analysis of multidrug resistance in vincristine-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR[J]. Proteomics, 2006, 6(6): 2009-2021
- [22] Kamada M, So A, Muramaki M, et al. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1): 299-308
- [23] Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, et al. Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine[J]. Int J Oncol, 2007, 31(6): 1345-1350
- [24] Wall NR, Shi Y. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? Lancet, 2003, 362(9393): 1401-1403
- [25] Chi JT, Chang HY, Wang NN, et al. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(11): 6343-6356
- [26] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811
- [27] Hannon GJ, Conklin DS. RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells [J]. Methods Mol Biol, 2004, 257: 255-266
- [28] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553
- [29] Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Harel-Bellan A. RNA interference and its possible use in cancer therapy[J]. Bull Cancer, 2004, 91(1): 15-18
- [30] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836): 494-498