

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2006 )05-0343-06

## shRNA 逆转耐阿霉素人乳腺癌细胞株( MCF-7/AdrR )的多药耐药性

干惠珠<sup>1</sup>, 张桂珍<sup>2</sup>, 张凤春<sup>3</sup>, 卜丽莎<sup>2</sup>, 杨绍娟<sup>2</sup>, 高 申<sup>2</sup>, 郑德明<sup>2</sup>( 1. 吉林大学中日联谊医院 肿瘤科, 长春 130031; 2. 吉林大学中日联谊医院中心研究室; 3. 上海交通大学医学院仁济医院肿瘤科, 上海 200001 )

[ 摘 要 ] **目的:** 利用短发夹 RNA( short hairpin RNA, shRNA )表达载体逆转耐阿霉素人乳腺癌细胞株( MCF-7/AdrR )的多药耐药性( multidrug resistance, MDR )。 **方法:** 构建 2 个 *MDR1* 基因 shRNA 表达质粒, 稳定转染 MCF-7/AdrR 细胞。 RT-PCR 分析 *MDR1* 基因 mRNA 的表达, Western blotting 检测 P-糖蛋白( P-gp )的表达, 流式细胞术和 MTT 法分别检测乳腺癌细胞的凋亡和对阿霉素的敏感性, 激光共聚焦荧光显微镜检测细胞内柔红霉素的稳态积累。 **结果:** 稳定转染 pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo *MDR1-A* 和 *MDR1-B* shRNA 表达质粒的 MCF-7/AdrR 细胞, RT-PCR 结果显示 *MDR1* 基因 mRNA 表达分别减少到 37.6% 和 28.0%, Western blotting 结果显示 P-gp 表达被明显而特异地抑制。 转染细胞对阿霉素的耐药性由 162 倍分别减低至 108 倍和 50 倍, 并且 *MDR1* shRNA 表达质粒增加 MCF-7/AdrR 细胞内柔红霉素的积累。 *MDR1* shRNA 表达质粒和阿霉素联合应用可诱导 MCF-7/AdrR 细胞的凋亡。 **结论:** shRNA 表达质粒有效地逆转多药耐药, 使耐药的肿瘤细胞恢复对化疗药物的敏感性。

[ 关键词 ] 短发夹 RNA; RNA 干扰; 多药耐药基因 1; 乳腺癌细胞

[ 中图分类号 ] R73-3 [ 文献标识码 ] A

## Short hairpin RNA expression reversing *MDR1* gene-dependent multidrug resistance of human breast cancer cell line ( MCF-7/AdrR )

GAN Hui-zhu, ZHANG Gui-zhen, ZHANG Feng-chun, BU Li-sa, YANG Shao-juan, GAO Shen, ZHENG De-ming ( 1. Department of Oncology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130031, China; 2. Department of Central Research, China-Japan Union Hospital, Jilin University; 3. Department of Oncology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To reverse multidrug resistance ( MDR ) of human breast cancer cell line ( MCF-7/AdrR ) to adriamycin ( ADM ) with short hairpin RNA ( shRNA ) expression vectors. **Methods:** Two shRNA expression vectors harboring *MDR1* gene were constructed and introduced into MCF-7/AdrR cells. Expression of *MDR1* mRNA was assessed by RT-PCR and P-gp expression was determined by Western blotting. The apoptosis and sensibility of the breast cancer cells to ADM were evaluated by flow cytometry and MTT assays, respectively. Cellular daunorubicin accumulation was assayed by laser scanning confocal microscope ( LSCM ). **Results:** RT-PCR showed that *MDR1* mRNA expression was significantly reduced to 37.6 % (  $P < 0.05$  ) and 28.0% (  $P < 0.01$  ) in MCF-7/AdrA cells stably transfected with pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo *MDR1-A* and *MDR1-B* shRNA, respectively. Western blotting showed that P-gp expression was inhibited significantly and specifically. Resistance against ADM was decreased from 162-fold to 108-fold (  $P < 0.05$  ) and 50-fold (  $P < 0.01$  ). Furthermore, shRNA vectors significantly enhanced the cellular daunorubicin accumulation. *MDR1* shRNA vectors combined with ADM significantly induced the apoptosis of MCF-7/AdrR cells. **Conclusion:** shRNA vectors can effectively reverse MDR and can restore the sensitivity of drug-resistance cancer cells to conventional chemotherapeutic agents.

[ **Keywords** ] short hairpin RNA; RNA interference; multidrug resistance gene 1 ( *MDR1* ); breast neoplasm cell

[ Chin J Cancer Biother, 2006, 13( 5 ): 343-348 ]

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金资助项目( No. 30171064 ); 吉林大学创新基金资助( No. 2003CX045 )

[ 作者简介 ] 干惠珠( 1972- ), 女, 吉林省长春市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事血液肿瘤方面的研究

[ 通讯作者 ] 张桂珍, E-mail: zhanggui - zhenjlu@ yahoo. com

肿瘤细胞对抗肿瘤药物的多药耐药(multidrug resistance, MDR)是化疗失败的主要原因之一<sup>[1]</sup>。肿瘤多药耐药的一个主要原因是肿瘤细胞内 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的过表达<sup>[2]</sup>。P-gp 是 *MDR1* 基因编码的相对分子质量为 170 000 的跨膜磷糖蛋白,能够转运多种结构和功能不同的化疗药物<sup>[3]</sup>。尽管逆转肿瘤 MDR 的研究已经取得了一些进展<sup>[4-8]</sup>,但临床应用还存在许多问题,迫切需要新的治疗策略。RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)是一种新的特异性封闭目的基因表达的方法,21~23 nt 的 siRNA(small interfering RNA, siRNA)导入哺乳动物细胞可特异性封闭目的基因的表达<sup>[9-11]</sup>。然而,转染合成的 siRNA 在哺乳动物细胞内仅表达数天。最近发展的载体介导方法,可以在哺乳动物细胞内长期产生短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA),引起目的基因 mRNA 的持续降解<sup>[12-16]</sup>。本研究构建 2 个 *MDR1* 基因的 shRNA 表达质粒,转染耐阿霉素的乳腺癌细胞,逆转该细胞株的多药耐药性。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和细胞株

pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo siRNA 表达载体购于美国 Ambion 公司,敏感的和耐阿霉素的人乳腺癌细胞株 MCF7/S、MCF7/AdrR 由上海交通大学医学院附属仁济医院张凤春教授惠赠。

### 1.2 主要试剂和设备

T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司, *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶购自日本 TaKaRa 公司,质粒抽提试剂盒 DNA purification system Wizard<sup>®</sup> plus SV Minipreps 购自美国 Promega 公司, siPORT<sup>TM</sup> XP-1 转染试剂购自美国 Ambion 公司, RPMI 1640 培养基、胎牛血清和 TR-Izol 试剂购自美国 Gibco BRL 公司,阿霉素(Adriamycin, ADM)购自辉瑞公司, RevertAid<sup>TM</sup> First-Strand cDNA 合成试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司, MTT 购自美国 Sigma 公司,小鼠抗人 P-gp 单克隆抗体 F4 购自美国 Neo Markers 公司,碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG 购自北京中山生物技术公司, BCIP/NBT 购自福建迈新生物技术公司。主要仪器:上海天能科技有限公司 GIS-2008 凝胶图像分析系统,美国 Hitachi 低温高速离心机,北京六一仪器厂 DYY-28A 型转移电泳仪,日本日立公司 U-3410 型紫外分光光度计,美国 PE 公司 Gene Amp PCR System 9700 PCR 扩增仪,德国产 Leica 激光共聚焦荧光显微镜。

### 1.3 *MDR1* 基因 shRNA 表达质粒的构建

根据 GeneBank P-gp 编码基因 *MDR1* mRNA 的已知序列(accession number AF 016535),选择 2 个 shRNA

特异性靶位点序列。合成 *MDR1* 基因 shRNA,插入模板寡核苷酸,其含有正义靶序列、环状结构、反义靶序列及 *Bam*H I 和 *Hind* III 的酶切位点。模板寡核苷酸退火,连接到线性化的 pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo siRNA 表达载体,两个 shRNA 表达质粒分别命名为 pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo *MDR1*-A(2745-2765)和 pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo *MDR1*-B(3564-3584)。连接产物转化,提取质粒,测序,纯化。

### 1.4 细胞培养

所有细胞均用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。MCF-7/AdrR 细胞株是由阿霉素诱导 MCF7/S 细胞建立的 *MDR1* 基因表达阳性的多药耐药细胞株<sup>[17]</sup>。为了维持耐药亚型,培养液中加入 1.0 μg/ml 的阿霉素。试验前 2 周换用无阿霉素的培养液。

### 1.5 shRNA 表达质粒转染

取对数生长期的 MCF-7/AdrR 细胞,以 2 × 10<sup>5</sup>/孔接种至 6 孔板中,培养 24 h 后按照转染试剂说明书用 siPORT<sup>TM</sup> XP-1 转染试剂转染 shRNA 表达质粒。实验设 1 个阴性对照、1 个阳性对照。阴性对照质粒是一个编码 shRNA 的环形质粒,其序列与小鼠、人、大鼠基因组序列无同源性;另设 GFP 阳性对照组。转染 48 h 后,用胰酶消化细胞,将细胞培养在选择培养液中。用 800 μg/ml G418 筛选而建立稳定表达 shRNA 的 MCF-7/AdrR 细胞克隆。每隔 3~5 d 换液 1 次,4 周左右出现抗 G418 耐药克隆,胰酶消化,传代并培养在选择培养液中,以 200 μg/ml G418 维持。

### 1.6 RT-PCR 检测 *MDR1* 基因 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂按说明书提取细胞内总 RNA,1% 甲醛变性电泳鉴定,紫外分光光度计定量。用 RevertAid<sup>TM</sup> First-Strand cDNA 合成试剂盒逆转录成 cDNA。逆转录反应体系为 20 μl:总 RNA 5 μg,0.5 μg/μl oligo(dT)<sub>18</sub> 引物 1 μl, DEPC 水 11 μl,5 × 逆转录缓冲液 4 μl,20 U/μl RNasin 1 μl,10 mmol/L dNTP 2 μl,200 U/μl RevertAid<sup>TM</sup> M-Mulv 逆转录酶 1 μl。逆转录反应条件:42℃ 逆转录 60 min,70℃ 10 min 终止。逆转录合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。*MDR1* 引物:正义链:5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3';反义链:5'-GTTCAAACCTCTGCTCCTGA-3';扩增产物为 157 bp。内对照 *β-actin* 引物:正义链:5'-CTTCTACAATGAGCTCCGTG-3';反义链:5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3';扩增产物为 305 bp。PCR 反应体系 50 μl:cDNA 模板 5 μl,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5 μl,5 U/μl Taq 酶 5 μl,5 μmol/L *MDR1* 引物各 2.5 μl,10 × PCR 缓冲液 5 μl,加

ddH<sub>2</sub>O 至终体积 50  $\mu$ l。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 35 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共进行 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统紫外照相扫描分析, 以 *MDR1*/ $\beta$ -actin 进行 *MDR1* 基因表达的半定量分析。

### 1.7 Western blotting 分析 P-gp 蛋白的表达

收集细胞, PBS 洗 2 次, 以 200  $\mu$ l 细胞裂解液[ 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 5 mmol/L EDTA, 25% 蔗糖, 100  $\mu$ g/ml PMSF 0.6  $\mu$ l, 2.4  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇 ]冰浴裂解细胞 30 min, 4  $^{\circ}$ C 13 000 r/min 离心 45 min。提取 100  $\mu$ g 总蛋白, 经 8% SDS-PAGE 分离后, 转移到硝纤维膜。室温封闭过夜, 加入 1:100 小鼠抗人 P-gp 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 然后加入 1:500 碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG, 室温孵育 2 h, 最后 BCIP/NBT 显色。以  $\beta$ -actin 作为内对照。

### 1.8 MTT 法检测细胞对化疗药物的敏感性

取对数生长期的细胞,  $2 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔培养板, 每孔 180  $\mu$ l。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后, 加入不同浓度的阿霉素, 继续培养 48 h, 各孔再加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 培养 4 h 后 490 nm 波长处用酶标仪测定光密度 (*D*) 值, 计算 IC<sub>50</sub> 及相对逆转率, 实验重复 3 次。相对逆转率 = (IC<sub>50</sub>A - IC<sub>50</sub>B) / (IC<sub>50</sub>A - IC<sub>50</sub>C), 其中 IC<sub>50</sub>A 是 MCF-7/AdrR 细胞的 IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>B 是转染 shRNA 质粒的 MCF-7/AdrR 细胞的 IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>C 是化疗敏感的 MCF-7/S 细胞的 IC<sub>50</sub>。

### 1.9 细胞内柔红霉素积累的测定

转染 shRNA 表达质粒和对照质粒的细胞分别与 1.0  $\mu$ g/ml 柔红霉素 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 冰冷的 PBS 洗 3 次终止反应。在激光共聚焦荧光显微镜下观察并采集图像, 分析结果。

### 1.10 流式细胞仪检测细胞凋亡

提取 1.0  $\mu$ g/ml 阿霉素和 shRNA 表达质粒共同作用的  $1 \times 10^6$  个细胞, PBS 洗 2 次, 预冷的 70% 乙醇固定 24 h, PBS 洗 3 次, 10  $\mu$ g/ml RNase 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min, 50  $\mu$ g/ml PI 染液 4 $^{\circ}$ C 避光染色 1 h, 流式细胞仪检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

### 1.11 统计学处理

实验数据应用 SPSS10.0 软件处理。所有数据均用均数  $\pm$  标准差的形式表示, 两小样本均数的比较用配对 *t* 检验, 抑制率采用直线回归分析。

## 2 结果

### 2.1 *MDR1* 基因 shRNA 表达质粒的鉴定

DNA 测序结果证实, *MDR1* shRNA 插入模板寡核苷酸和线性化 pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo siRNA 表达载体

连接成功。

### 2.2 pcDNA 3.0 EGFP 和 GFP shRNA 表达质粒共转染在耐药细胞中的表达情况

激光共聚焦荧光显微镜检测显示, MCF7/AdrR 细胞转染 pcDNA3.0 EGFP 质粒后 4 h, 部分细胞表达绿色荧光蛋白, 在 4 ~ 48 h 内表达绿色荧光的细胞数量逐渐增多, 在 48 h 达到高峰, 其转染细胞内出现大量明亮的绿色荧光; 而阳性对照 GFP shRNA 表达质粒共转染后细胞内绿色荧光明显减少、亮度减弱。

### 2.3 shRNA 表达质粒抑制 *MDR1* 基因 mRNA 的表达

由图 1 可见, 稳定转染 pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo *MDR1*-A 表达载体的阳性细胞克隆, mRNA 表达比值 (*MDR1*/ $\beta$ -actin) 为  $0.35 \pm 0.076$ ; 转染 pSilencer<sup>TM</sup> 3.1-H1 neo *MDR1*-B 表达载体的阳性细胞克隆, mRNA 表达比值 (*MDR1*/ $\beta$ -actin) 为  $0.26 \pm 0.029$ 。两者与阴性对照质粒组相比, *MDR1* 基因 mRNA 表达分别减少到 37.6% ( $P < 0.05$ ) 和 28.0% ( $P < 0.01$ )。

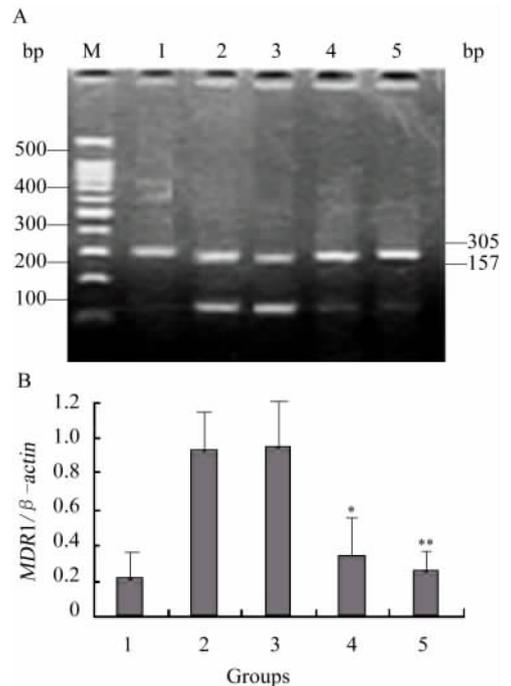


图1 稳定转染 *MDR1* shRNA 表达载体对 MCF-7/AdrR 细胞 *MDR1* mRNA 表达的影响

Fig.1 Effect of shRNA transfection on *MDR1* mRNA expression in MCF-7/AdrR cells

A: RT-PCR results of transfection with shRNA expression vectors; B: Expression levels of *MDR1* measured by RT-PCR and normalized by  $\beta$ -actin. M: 100 bp DNA marker; 1: Drug-sensitive MCF-7 cells; 2: MDR MCF/AdrR cells; 3: Transfected with circle negative control plasmid; 4: Transfected with *MDR1*-A shRNA vector; 5: Transfected with *MDR1*-B shRNA vector.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs MDR MCF-7/AdrR cells

2.4 shRNA 表达载体抑制 P-gp 蛋白的表达

由图 2 可见,稳定转染 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-A 载体的阳性细胞克隆的蛋白表达比值 (P-gp/β-actin)为 0.26 ± 0.029,而转染 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-B 载体的阳性细胞克隆的蛋白表达比值 (P-gp/β-actin)为 0.23 ± 0.016。与阴性对照质粒组相比,稳定转染 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-A 和 MDR1-B shRNA 表达载体显著降低 MCF-7/AdrR 细胞 P-gp 的表达水平 (P < 0.05),但 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-A 和 MDR1-B shRNA 表达载体间差异无显著性 (P > 0.05)。

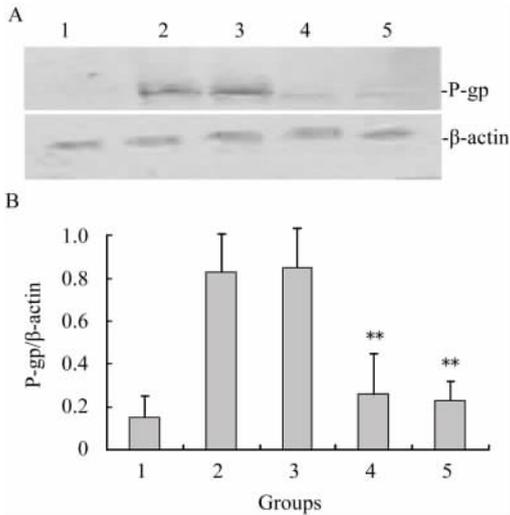


图 2 稳定转染 MDR1 shRNA 表达载体对 MCF-7/AdrR 细胞 P-gp 表达的影响

Fig.2 Effect of shRNA transfection on cellular P-gp expression in MCF-7/AdrR cells

A: Western blotting of P-gp expression in MCF-7/AdrR cells transfected with shRNA expression vectors; B: Expression levels of P-gp measured by Western blotting and normalized by β-actin. 1: Drug-sensitive MCF-7 cells; 2: MDR MCF/AdrR cells; 3: Cells transfected with circle negative control plasmid; 4: Cells transfected with MDR1-A shRNA vector; 5: Cells transfected with MDR1-B shRNA vector. \*\* P < 0.01 vs MDR MCF-7/AdrR cells

2.5 阿霉素对耐药乳腺癌细胞的细胞毒作用

稳定转染 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-A 载体后,阳性细胞克隆对阿霉素耐药从 162 倍降至 108 倍,减少到原值的 66.19%,逆转 33.81% (p < 0.05);而稳定转染 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-B 载体,阳性细胞克隆对阿霉素耐药从 162 倍降至 50 倍,逆转 71.16% (P < 0.01)。结果显示,与对照组相比,MDR1 shRNA 载体可逆转乳腺癌细胞对阿霉素的耐药, pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-B shRNA 载体增强化疗敏感性的作用大于 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-A shRNA 载体

(P < 0.05,表 1)。

表 1 阿霉素对稳定转染 shRNA 载体的 MCF-7/AdrR 细胞的细胞毒作用

Tab.1 Cytotoxic effects of doxorubicin treated with hairpin shRNA vectors in MCF-7/AdrR cells

Groups	IC <sub>50</sub> ( μg/ml)	Reversal rate( %)
MCF-7	0.35 ± 0.71	
MCF-7/AdrR	56.86 ± 0.28	
MCF-7/AdrR + Control circle plasmid	53.17 ± 0.47	6.55
MCF-7/AdrR + MDR1-A shRNA vector	37.82 ± 0.17*	33.81
MCF-7/AdrR + MDR1-B shRNA vector	16.79 ± 0.14**	71.16

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs MCF-7/AdrR or MCF-7/AdrR + Control circle plasmid group

2.6 细胞内柔红霉素的稳态积累

用激光共聚焦荧光显微镜检测细胞内柔红霉素的稳态积累。结果显示,稳定转染 MDR1 shRNA 载体可增加细胞内化疗药物的积累。由图 3 可见,转染 MDR1 shRNA 载体,肿瘤细胞内的荧光强度与对照组相比显著增加,转染 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-B shRNA 载体细胞内的荧光强度高于转染 pSilencer™ 3.1-H1 neo MDR1-A shRNA 载体的细胞。

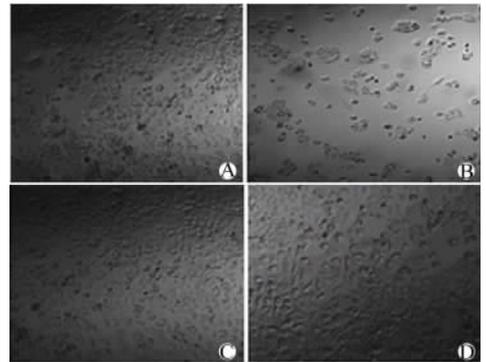


图 3 稳定转染 MDR1 shRNA 表达载体对 MCF-7/AdrR 细胞内柔红霉素积累的影响 (×100)

Fig.3 Effect of MDR1 shRNA vectors on the accumulation of daunorubicin in MCF-7/AdrR cells

A: Drug-sensitive MCF-7 cells; B: Multidrug-resistance MCF/AdrR cells; C: The cells transfected with MDR1-A hairpin siRNA vector; D: The cells transfected with MDR1-B hairpin siRNA vector

## 2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

流式细胞仪检测联合使用 *MDR1* shRNA 载体和 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  阿霉素对细胞凋亡的影响。如表 2 所示, 转染 *MDR1* shRNA 载体后, 再加入 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  阿霉素, 凋亡细胞百分率显著增加, *MDR1* 发夹 shRNA 载体联合阿霉素可明显诱导耐阿霉素的 MCF-7/AdrR 细胞的凋亡(  $P < 0.05$  )。

表 2 联合应用 *MDR1* shRNA 载体和阿霉素致细胞凋亡的变化

Tab. 2 Apoptosis of cells induced by combination of *MDR1* hairpin shRNA vectors with doxorubicin

Groups	Apoptosis rate ( % )
MCF-7	98.1
MCF-7/AdrR	0.9
MCF-7/AdrR + Control circle plasmid	1.4
MCF-7/AdrR + <i>MDR1-A</i> hairpin shRNA vector	19.6*
MCF-7/AdrR + <i>MDR1-B</i> hairpin shRNA vector	25.3*

\*  $P < 0.05$  vs MCF-7/AdrR or MCF-7/AdrR + Control circle plasmid group

## 3 讨论

RNAi 是通过转录后基因沉默抑制目的基因表达的一种新技术。21 ~ 23 nt 短链 RNA( siRNA ) 导入哺乳动物细胞, 可引起序列特异性内源性目的基因 mRNA 的降解和基因表达的有效抑制。但是转染体外合成的 siRNA 仅短期内抑制目的基因表达, 并且只限于容易转染的细胞<sup>[18-21]</sup>。最近报道<sup>[10,16,22]</sup>, 载体介导的 shRNA 表达系统在许多生物体内有效地抑制目的基因的表达, 表达载体能够在 RNA 聚合酶 III 启动子( H1 或 U6 ) 的控制下在体内转录产生 shRNA。shRNA 表达载体的优点是能够较长时间抑制目的基因的表达, 同时 shRNA 的转录对转染的细胞无毒性作用。

P-gp 是一种药物转运蛋白, 在 P-gp 蛋白过表达的肿瘤细胞常表现对多种化疗药物的耐药, 导致肿瘤化疗的失败<sup>[23-24]</sup>, 抑制 P-gp 的功能和表达能够恢复化疗药物的敏感性, 从而逆转耐药。研究报道<sup>[25-26]</sup>, 将针对 *MDR1* 基因设计的 siRNA 分别导入多药耐药的人乳腺癌细胞系和胰腺癌细胞系( EPP85-181 RDB ), 结果显示 *MDR1* siRNA 显著抑制 *MDR1* mRNA 和 P-gp 的表达, 增加细胞内药物的积累。但是这些研究中沉默 P-gp 表达的影响是瞬时而短暂的, *MDR1* mRNA 表达的

最大抑制出现在转染后 24 h, 24 h 后开始逐渐恢复, 到 72 h 恢复到原来的水平。近期研究报道<sup>[27-29]</sup>, 载体介导的 siRNA 表达系统转染 EPG85-257RDB, 耐阿霉素的 K562 细胞系和人结肠腺癌( Caco-2 ) 细胞系, 有效而长期地抑制 *MDR1* 基因的表达, 恢复化疗药物的敏感性, 从而逆转肿瘤多药耐药。特别是在 Caco-2 细胞, 长期冻存后复苏的 RNAi-*MDR1* 克隆仍保持 *MDR1* 基因低水平表达<sup>[29]</sup>。

本研究根据 *MDR1* 基因的相关研究和 <http://www.ambion.com> 网站的设计工具<sup>[25]</sup>, 从人 *MDR1* 基因的 2 个不同区域选择 19 bp 的靶位点, 构建了 2 个 hH1 启动子控制下靶向 *MDR1* 基因的 shRNA 表达载体, 将其导入耐阿霉素的人乳腺癌细胞。RT-PCR 检测稳定转染 *MDR1* shRNA 表达载体对 *MDR1* mRNA 表达的影响。结果显示, 稳定转染后 *MDR1* mRNA 表达被显著抑制, 而对照质粒对 *MDR1* mRNA 的表达无显著性影响。并且, pSilencer™ 3.1-H1 neo *MDR1-B* shRNA 载体对 *MDR1* mRNA 表达的影响和 pSilencer™ 3.1-H1 neo *MDR1-A* shRNA 载体相比无显著性差异。Western blotting 检测 shRNA 表达载体稳定转染 MCF-7/AdrR 细胞 P-gp 的表达。结果显示, 稳定转染 *MDR1* shRNA 载体能够长期降低 P-gp 表达。同时, 与 *MDR1* mRNA 表达相一致, pSilencer™ 3.1-H1 neo *MDR1-B* shRNA 载体对 P-gp 表达的影响和 pSilencer™ 3.1-H1 neo *MDR1-A* shRNA 载体相比较差异无显著性。阳性对照 GFP shRNA 表达质粒的转染验证 siPORT™ XP-1 转染试剂的转染效率符合实验要求, 可以用 siPORT™ XP-1 转染试剂进行 *MDR1* shRNA 表达质粒的转染。同时结果表明, GFP shRNA 表达质粒转染后抑制 GFP 的表达, 作为实验的阳性对照, 进一步证实基因沉默可引起序列特异性目的基因表达的抑制。

细胞毒实验结果显示, 稳定转染 shRNA 载体可恢复 MCF-7/AdrR 细胞对阿霉素的敏感性, 并且, 与 pSilencer™ 3.1-H1 neo *MDR1-A* shRNA 载体相比, pSilencer™ 3.1-H1 neo *MDR1-B* shRNA 载体的逆转作用更强些。*MDR1* shRNA 载体增加 MCF-7/AdrR 细胞内柔红霉素的积累, 恢复 P-gp 泵功能, 从而逆转肿瘤多药耐药。*MDR1* shRNA 载体联合阿霉素可明显诱导耐阿霉素的 MCF-7/AdrR 细胞的凋亡。研究显示, 质粒载体介导的 siRNA 系统是一个有发展潜力的下调靶基因表达的方法, 可以在耐药细胞内有效“敲除” *MDR1* 基因和 P-gp, 逆转 MDR, 恢复化疗药物的敏感性。

目前, 为了真正将 RNAi 技术应用于临床治疗, 许多问题尚待解决。一个主要问题是有效和高效率靶位点的选择, 以及如何使用简单的方法发现最佳的靶位点。

另一个问题是如何有效而特异地将 siRNA 表达载体导入靶细胞。有报道腺病毒载体在体内可高效转运 siRNA 表达载体<sup>[30]</sup>。将来,同时封闭 2 个或更多的肿瘤相关基因(包括 *MDR1* 基因)将会更有效、更显著地逆转肿瘤细胞的耐药。随着 RNAi 技术的进展,一定可为临床提供一种有应用前景的用于多药耐药肿瘤的基因治疗手段。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ling V. Multidrug resistance and P-glycoprotein expression[ J ]. Ann N Y Acad Sci, 1987, 507: 7-8.
- [ 2 ] Roninson IB, Chin JE, Choi KG, et al. Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistance KB carcinoma cells[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83( 12 ): 4538-4542.
- [ 3 ] Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer[ J ]. Pharmacol Rev, 1990, 42( 3 ): 155-199.
- [ 4 ] Sonneveld P, Durie BG, Lokhurst HM, et al. Modulation of multidrug-resistance multiple myeloma by cyclosporin[ J ]. Lancet, 1992, 340( 8814 ): 255-259.
- [ 5 ] Volm M. Multidrug resistance and its reversal[ J ]. Anticancer Res, 1998, 18( 4C ): 2905-2917.
- [ 6 ] Liu C, Qureshi IA, Ding X, et al. Modulation of multidrug resistance gene ( *mdr-1* ) with antisense oligodeoxynucleotides[ J ]. Clin Sci, 1996, 91( 1 ): 93-98.
- [ 7 ] Stuart DD, Kao GY, Allen TM. A novel, long-circulating, and functional liposomal for modulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against *MDR1*[ J ]. Cancer Gene Ther, 2000, 7( 3 ): 466-475.
- [ 8 ] Holm PS, Scanlon KJ, Dietel M. Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive pancreatic cell lines ( EPP85-181 RDB ) by introduction of a hammerhead ribozyme[ J ]. Br J Cancer, 1994, 70( 2 ): 239-243.
- [ 9 ] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate[ J ]. EMBO J, 2001, 20( 23 ): 6877-6888.
- [ 10 ] Yu JY, De Ruiter SL, Turner DL, et al. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99( 9 ): 6047-6052.
- [ 11 ] Kisielow M, Kieiner S, Nagasawa M, et al. Isoform-specific knock-down and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA[ J ]. Biochem J, 2002, 363( Pt1 ): 1-5.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs ( shRNAs ) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[ J ]. Genes Dev, 2002, 16( 8 ): 948-958.
- [ 14 ] Paul CP, Good PD, Winer I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells[ J ]. Nat Biotechnol, 2002, 20( 5 ): 505-508.
- [ 15 ] Sui G, Soohoo C, Affarell B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress expression in mammalian cells[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99( 8 ): 5515-5520.
- [ 16 ] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[ J ]. Nat Biotechnol, 2002, 20( 5 ): 497-500.
- [ 17 ] Cohen JS, Lyon RC, Chen C, et al. Differences in phosphate metabolite levels in drug-sensitive and-resistance human breast cancer cell line determined by <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy[ J ]. Cancer Res, 1986, 46( 8 ):4087-4090.
- [ 18 ] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[ J ]. Cell, 2000, 101( 1 ): 25-33.
- [ 19 ] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[ J ]. Nature, 2001, 409( 6818 ):363-366.
- [ 20 ] Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, et al. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi[ J ]. Science, 2001, 293( 5532 ):1146-1150.
- [ 21 ] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[ J ]. Methods, 2002, 26( 2 ): 199-213.
- [ 22 ] Czauderna F, Fechtner M, Aygun H, et al. Functional studies of the PI( 3 )-kinase signaling pathway employing synthetic and expressed siRNA[ J ]. Nucleic Acid Res, 2003, 31( 2 ): 670-682.
- [ 23 ] Lin JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein[ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55( 1 ): 53-81.
- [ 24 ] Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette ( ABC ) family[ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55( 1 ): 3-29.
- [ 25 ] Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of *MDR1* ( P-Glycoprotein ) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells[ J ]. Cancer Res, 2003, 63( 7 ): 1515-1519.
- [ 26 ] Nieth C, Prebsch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multidrug resistance ( *MDR* ) phenotype by RNA interference ( RNAi )[ J ]. FEBS Lett, 2003, 545( 2-3 ): 144-150.
- [ 27 ] Stege A, Priebsch A, Nieth C, et al. Stable and complete overcoming of *MDR1*/P-glycoprotein mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference[ J ]. Cancer Gene Ther, 2004, 11( 11 ): 699-706.
- [ 28 ] Yague E, Higgins CF, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting *MDR1*[ J ]. Gene Ther, 2004, 11( 14 ): 1170-1174.
- [ 29 ] Celius T, Garberg P, Lundgren B. Stable suppression of *MDR1* gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells[ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324( 1 ): 365-371.
- [ 30 ] Boden D, Pusch O, Lee F, et al. Efficient gene transfer of HIV-1 specific short hairpin RNA into human lymphocytic cells using recombinant adeno-associated virus vectors[ J ]. Mol Ther, 2004, 9( 3 ): 396-402.

[ 收稿日期 ] 2006 - 09 - 24

[ 修回日期 ] 2006 - 10 - 08

[ 本文编辑 ] 王莹