

## · 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.012

**CIAPINI 基因 RNA 干扰载体的构建及其对乳腺癌细胞耐药性的影响**

路丹,王文秀,高树建,信涛,邓立力,徐玉清(哈尔滨医科大学附属第二临床医院 肿瘤内科,黑龙江 哈尔滨 150086)

**[摘要]** **目的:**构建针对 *CIAPINI* 基因的慢病毒 siRNA 表达载体并稳定转染人乳腺癌多柔比星耐药细胞 MCF-7/ADM,观察该基因对乳腺癌细胞耐药性的影响。**方法:**设计合成针对 *CIAPINI* 的 siRNA 重组质粒表达载体,并筛选出最有效的干扰序列,使用病毒包装系统进行慢病毒颗粒的包装和生产,获取 ADM-*CIAPINI* RNAi 稳定表达细胞株;MTT 法检测 *CIAPINI* 基因干扰前后细胞对于不同化疗药物 IC<sub>50</sub> 值的变化。**结果:**测序验证针对 *CIAPINI* 的 siRNA 重组质粒构建成功,并筛选 *CIAPINI*-siRNA1 为最佳干扰序列;以慢病毒为载体将干扰表达质粒稳定转染入乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 后,抑制 *CIAPINI* 表达水平超过 88%。RNA 干扰后紫杉醇、多柔比星及吉西他滨 3 种抗肿瘤药物对于 MCF-7/ADM 细胞的 IC<sub>50</sub> 值均显著下降 [(7.12 ± 0.31), (11.21 ± 1.79), (49.72 ± 4.52) vs (1.13 ± 0.06), (4.51 ± 0.20), (18.30 ± 1.27) μg/ml, P < 0.01],说明该细胞的耐药性明显减弱。**结论:**针对 *CIAPINI* 基因的慢病毒 siRNA 表达载体可以有效抑制 MCF-7/ADM 细胞中该基因的表达,*CIAPINI* 基因表达下调可使乳腺癌细胞的多药耐药性发生逆转。

**[关键词]** 乳腺癌; *CIAPINI* 基因; RNA 干扰; 多药耐药性; 紫杉醇; 多柔比星; 吉西他滨

**[中图分类号]** R737.9; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)01-0066-06

**Construction of *CIAPINI*-RNAi vector and its effect on drug resistance of breast cancer cells**

LU Dan, WANG Wen-xiu, GAO Shu-jian, XIN Tao, DENG Li-li, XU Yu-qing( Department of Oncology Medicine, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang, China )

**[Abstract]** **Objective:** To construct lentiviral expressed vector of siRNA targeting *CIAPINI* and establish breast cancer cells with a stable expression of siRNA-*CIAPINI*, and to investigate the effect of *CIAPINI* on breast cancer cells multi-drug resistance. **Methods:** The expressed vectors of recombinant plasmid of siRNA targeting *CIAPINI* were designed and synthesized. Select the most efficient interfering sequence, spackage, and produce a lentiviral vector with it. Stably transfect *CIAPINI*-RNAi into MCF-7/ADM cells. Detect IC<sub>50</sub> value of different drugs in MCF-7/ADM cells before and after *CIAPINI* interference by MTT. **Results:** The expressed vectors of recombinant plasmid of siRNA targeting *CIAPINI* were successfully synthesized and the most efficient interfering sequence was *CIAPINI*-siRNA1. Stable transfection of *CIAPINI*-RNAi into MCF-7/ADM cells by a lentiviral vector suppressed the expression of *CIAPINI* in MCF-7/ADM cells more than 88%. After RNA interference, IC<sub>50</sub> value of MCF-7/ADM cells to anticancer drugs ( paclitaxel, doxorubicin and gemcitabine ) significantly decreased from ( 7.12 ± 0.31 ), ( 11.21 ± 1.79 ), ( 49.72 ± 4.52 ) to ( 1.13 ± 0.06 ), ( 4.51 ± 0.20 ), ( 18.30 ± 1.27 ) μg/ml respectively, suggesting a significant decrease in the drug resistance of the cells. **Conclusion:** Lentiviral expressed vector of *CIAPINI*-siRNA can efficiently interfere the expression of *CIAPINI* in MCF-7/ADM cells. The study also confirmed the regulation effect of *CIAPINI* on breast cancer cell multi-drug resistance ( MDR ).

**[Key words]** breast cancer; *CIAPINI* gene; RNA interference; multi-drug resistance ( MDR ); paclitaxel; doxorubicin; gemcitabine

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19( 1 ): 61-66 ]

**[基金项目]** 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项资金项目( No. 2009RFQXS028 )。Project supported by Creative Talents in Science and Technology Foundation of Science and Technology Bureau of Harbin ( No. 2009RFQXS028 )

**[作者简介]** 路丹( 1972 - ),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士,主要从事恶性肿瘤的基因治疗研究

**[通信作者]** 路丹( LU dan, corresponding author ), E-mail: ludan1972@medmail.com.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120109.1651.002.html>

乳腺癌的发病率在我国呈逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。化疗是治疗乳腺癌特别是晚期乳腺癌非常重要的手段之一<sup>[2]</sup>,但常规化疗药物疗效差、患者预后不良是困扰临床的重要难题,而肿瘤的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)则是化疗失败的关键因素<sup>[3]</sup>。*CIAPIN1*(cytokine induced apoptosis inhibitor 1, 又称 anamorsin)是新近被证实的一种凋亡抑制因子,虽然其生理学功能尚未完全明确,但已有研究<sup>[4]</sup>显示,鼠的 *CIAPIN1* 可以阻止依托泊苷、 $\gamma$  射线等对 Ba/F3 细胞(IL-3 依赖的原 B 淋巴细胞)的杀伤,提示 *CIAPIN1* 可能与肿瘤的耐药性相关。本研究构建了针对 *CIAPIN1* 基因的 siRNA 重组慢病毒载体,并稳定转染入人乳腺癌多柔比星药细胞 MCF-7/ADM 中,探讨该基因对乳腺癌 MDR 的影响,为深入研究 *CIAPIN1* 基因的生理作用及利用 RNA 干扰技术克服乳腺癌的多药耐药奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

质粒载体、病毒包装系统及慢病毒包装细胞 293TN 购自美国 System Biosciences 公司, DH5 $\alpha$  感受态细胞、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 分子量标志物、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。Lipofectmaine<sup>TM</sup> 2000、DMEM、RPMI 1640 细胞培养基购自 Invitrogen 公司, *CIAPIN1* 一抗购自美国 Abcam 公司。紫杉醇注射液购自北京四环医药科技股份有限公司, 多柔比星购自 Sigma 公司, 吉西他滨注射液购自江苏豪森药业股份有限公司。人乳腺癌细胞株 MCF7 及 293 细胞购自中科院细胞库, 细胞株 MCF-7/ADM 购自上海交通大学。

### 1.2 *CIAPIN1* 基因 shRNA 的设计及 siRNA 重组表达载体的构建

根据 *CIAPIN1*(NM\_020313.2) 基因信息, 采用 Ambion 公司的网上设计软件(www.ambion.com) 选择 3 条针对其 CDS 区的 siRNA 序列: siRNA1, GGAGCCAGTAGAGACAGCT; siRNA2, GTGGTTCT-TCTAGGCAGC; siRNA3, GTCAGCTTGTGGAACTGC。根据每条 siRNA 序列, 设计两条互补的 DNA 模板单链, 模板链包括 siRNA 的正义链和反义链, 中间以 12 个脱氧核苷酸的 loop 结构(5'-CTTCCT-GTCAGA-3')相连, 后面接有 RNA Poly III 聚合酶转录中止位点(TTTTT), 同时模板链两端分别添加 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点, 合成相应的 DNA 单链(PAGE 级别)。(1)寡核苷酸序列退火及磷酸化:

互补的两条 Oligo DNA 分别溶于无菌水(终质量浓度 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 各取 1  $\mu\text{l}$  互补的 Oligo DNA, 加入聚核苷酸退火缓冲液, 95  $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min, 取出室温静置 1 h, 使其缓慢降温, 形成双链 DNA, 4  $^{\circ}\text{C}$  存放备用。(2)制备线性化 pSIH1-H1-copGFP 载体: pSIH1-H1-copGFP 载体用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶序贯酶切, 酶切反应产物行 0.5% 琼脂糖凝胶电泳, DNA 凝胶回收试剂盒回收线性载体, 调整质量浓度至 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , -20  $^{\circ}\text{C}$  保存待用。(3)将退火后稀释产物和经过线性化处理的载体 DNA 连接。(4)将 10  $\mu\text{l}$  重组连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$  细胞, 对于每条 siRNA 序列对应的阳性菌落, 每组挑取一个阳性菌扩增, 并使用 Mini Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 提取质粒。使用载体多克隆位点的上游引物(Foward primer: 5'-GCAGAGCTCGTTTACTGAACC-3')进行 DNA 测序。Oligo DNA 序列见表 1。

表 1 Oligo DNA 序列  
Tab. 1 Oligo DNA sequence

Gene	Sequence
<i>CIAPIN1</i> -f1	GATCCGGAGCCAGTAGAGACAGCTCTTCTCTG TCAGAAGCTGTCTCTACTGGCTCCTTTTTG
<i>CIAPIN1</i> -r1	AATTCAAAAAGGAGCCAGTAGAGACAGCTTC TGACAGGAAGAGCTGTCTCTACTGGCTCCG
<i>CIAPIN1</i> -f2	GATCCGTGGTTCTTCTAGGCAGCCTTCCTGT CAGAGCTGCCTAGAAGAACCACCTTTTTG
<i>CIAPIN1</i> -r2	AATTCAAAAAGTGGTTCTTCTAGGCAGCTCT GACAGGAAGGCTGCCTAGAAGAACCACG
<i>CIAPIN1</i> -f3	GATCCGTCAGCTTGTGGAACTGCCTTCCTGT CAGAGCAGTTTCCACAAGCTGACTTTTTG
<i>CIAPIN1</i> -r3	AATTCAAAAAGTCAGCTTGTGGAACTGCTC TGACAGGAAGGCAGTTTCCACAAGCTGACC
Negative-f	GATCCCGTTTAACTCTCCCAACCACTTCCTGT CAGATGTTGGGAGAGTTAAACGTTTTTG
Negative-r	AATTCAAAAACGTTTAACTCTCCCAACCATCT GACAGGAAGTGGTTGGGAGAGTTAAACGG

1.3 针对人 *CIAPIN1* 基因进行有效 siRNA 序列的筛选  
选生长良好的 293 细胞, 使用 Lipofectmaine<sup>TM</sup> 2000

转染试剂进行质粒转染实验,按说明书操作。转染细胞分组如下:(1)293 组;(2)293 细胞 + 空质粒组;(3)293 细胞 + control - siRNA 组;(4)293 细胞 + CIAPIN1-siRNA1 组;(5)293 细胞 + CIAPIN1 - siRNA2 组;(6)293 细胞 + CIAPIN1 - siRNA3 组。转染后 24、48 h 显微镜下观察,通过绿色荧光参照判断转染效率;使用 Real-time PCR 和 Western blotting 方法检测基因干扰后细胞中 *CIAPIN1* 基因表达状况,确定最有效的干扰序列。

#### 1.4 慢病毒表达载体构建及针对 MCF-7/ADM 细胞株的 RNA 干扰

使用慢病毒包装质粒混合物(500 ng/ $\mu$ l)和筛选确定的有效靶序列对应的重组质粒(500 ng/ $\mu$ l)共转染 293TN 细胞,进行慢病毒颗粒的包装和生产,使用梯度稀释法进行病毒滴度测定。然后使用标准 copGFP 标记的病毒液( $1 \times 10^4$  IFU/ $\mu$ g)感染处于生长状态良好的 MCF-7/ADM 细胞,确定细胞合适的最佳 MOI 值。病毒感染的细胞分为实验组(MCF-7/ADM + Lv-CIAPIN1-siRNA1)和对照组(MCF-7/ADM + Lv-Negative),感染前对细胞进行换液处理,对照组使用 RPMI 1640 + 10% FBS(含多柔比星 10  $\mu$ g/ml)的完全培养基,实验组细胞培养基不含多柔比星,然后按照最佳 MOI 值添加病毒液,正常条件培养;感染后 96 h,对照组细胞直接收集保存,待检;对于实验组细胞,进行克隆制作。根据细胞集落 GFP 荧光由强到弱,挑选 2 个荧光表达最强

的细胞孔,分别标记为 1、2 号克隆,对细胞克隆进行逐步放大培养并且收集不同代数的细胞样品(P1、P2、P3 代)。对于收集到的细胞样品,提取总 RNA 和总蛋白,进行 Real-time PCR 和 Western blotting 检测。

#### 1.5 MTT 法检测 *CIAPIN1* 基因干预前后不同药物对于细胞的 $IC_{50}$

取对数生长期的细胞(MCF7 细胞, MCF-7/ADM 细胞, MCF-7/ADM + Lv-CIAPIN1-siRNA1 细胞)接种到 96 孔细胞培养板,按照梯度稀释的方法将各种药物(紫杉醇、多柔比星、吉西他滨)加入细胞培养基中,37  $^{\circ}$ C 和 5%  $CO_2$  条件下培养细胞,24 h 后进行 MTT 检测,酶联检测仪测定光密度(D)值,检测波长 570 nm,参考波长 630 nm。细胞生长抑制率(%) = (1 - 实验组平均 D 值/对照组平均 D 值)  $\times$  100%。利用改良寇式法计算  $IC_{50}$  值。

#### 1.6 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,SPASS13.0 软件进行 t 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *CIAPIN1*-siRNA 重组质粒的鉴定

对于每条 siRNA 序列进行 DNA 测序,测序结果(图 1)与设计序列完全一致,说明已经将合成的寡核苷酸片段插入到 pSIH1-H1-copGFP 载体中。

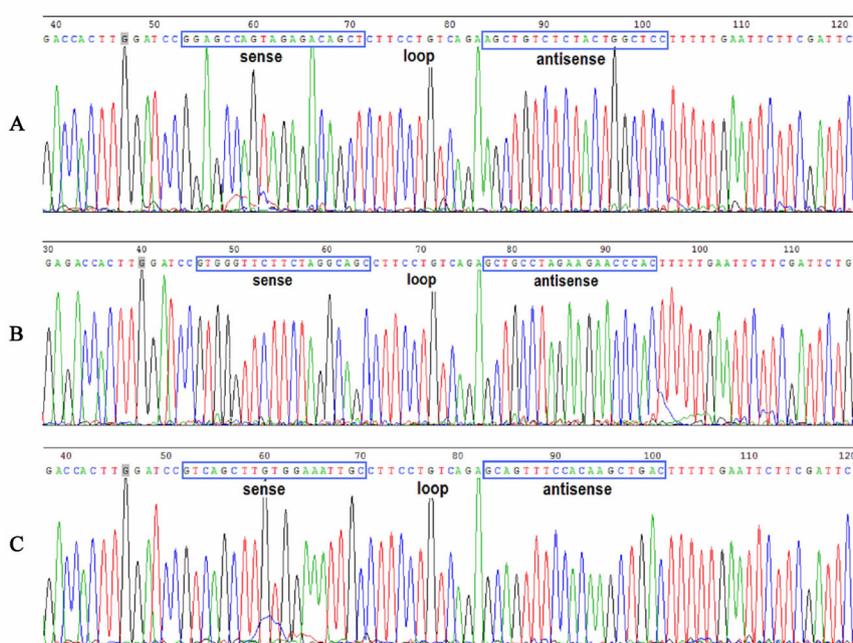


图 1 *CIAPIN1*-siRNA 质粒测序结果

Fig. 1 Sequence results of *CIAPIN1*-siRNA plasmid

A: *CIAPIN1*-siRNA1; B: *CIAPIN1*-siRNA2; C: *CIAPIN1*-siRNA3

## 2.2 *CIAPIN1* 有效 siRNA 序列的筛选

将重组质粒瞬时转染至 293 细胞中,转染后 24 h 后镜下观察细胞状态良好,中央饱满。荧光视场下观察,通过绿色荧光参照,转染效率大约为 60%。转染 48 h 后细胞略有收缩,培养基中细胞碎片略有增加;荧光视场下观察,转染效率大约为 90% (图 2)。Real-time PCR 和 Western blotting 检测结果(图 3、4)提示,3 个 siRNA 片段中 *CIAPIN1* 的基因转录量及蛋白表达水平以 *CIAPIN1*-siRNA1 最低,为最有效的干扰序列,可用于下一步的慢病毒 Lv-*CIAPIN1*-siRNA1 包装。

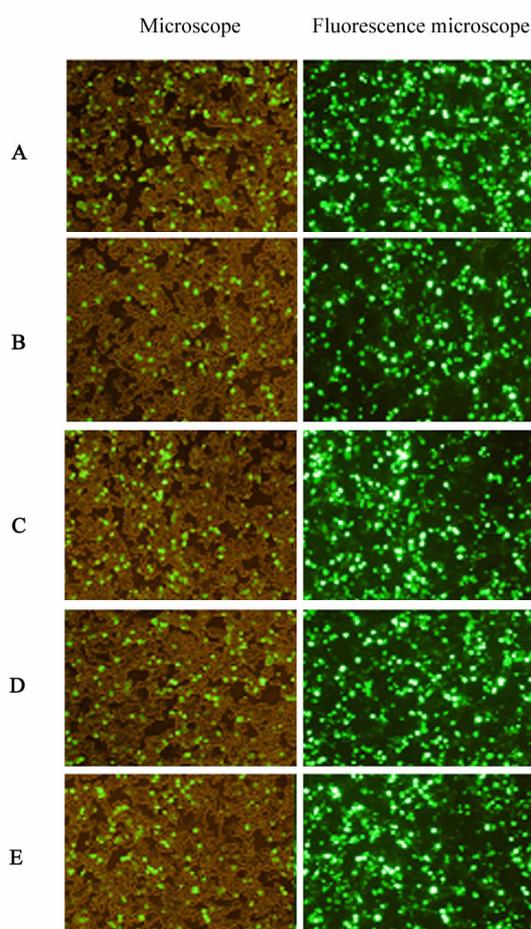


图 2 *CIAPIN1*-siRNA 质粒转染后 293 细胞的形态改变(×200)

Fig. 2 Morphologic changes of 293 cells after transfection with *CIAPIN1*-siRNA plasmid (×200)

A: Empty plasmid; B: Control-siRNA; C: *CIAPIN1*-siRNA1;  
D: *CIAPIN1*-siRNA2; E: *CIAPIN1*-siRNA3

## 2.3 Lv-*CIAPIN1*-siRNA1 稳定表达 MCF-7/ADM 细胞的建立

按照预实验测得的最佳 MOI 值(MOI 为 6),将

慢病毒表达载体转染入 MCF-7/ADM 细胞,经过筛选得到了稳定表达细胞株。Real-time PCR 检测表明,*CIAPIN1* 的沉默达到了 88% 以上;Western blotting 检测,蛋白水平也得到了相应的结果(抑制高于 83%),说明通过病毒途径对于 MCF-7/ADM 细胞获得了较高的基因转导效率,在 MCF-7/ADM 细胞中成功地进行了 *CIAPIN1* 基因的 RNA 干扰实验。比较感染后不同代数细胞克隆,可以发现随着细胞克隆代数增加,GFP 表达未有明显变化;稳定表达细胞株中目的基因相对于内参的表达量不随细胞代数的变化而变化;MCF-7/ADM-Lv-*CIAPIN1*-siRNA1 稳定表达细胞株质量较好(图 5、6)。

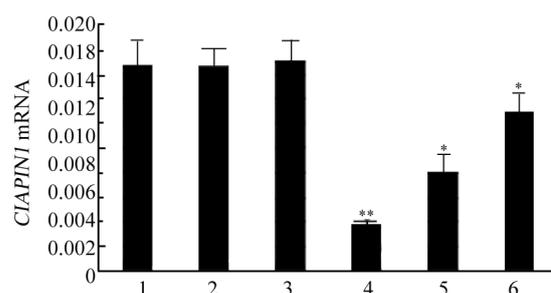


图 3 *CIAPIN1*-siRNA 质粒转染后 293 细胞 *CIAPIN1* mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of *CIAPIN1* mRNA in 293 cells after transfection with *CIAPIN1*-siRNA plasmid

1: Control group; 2: Empty plasmid; 3: Control-siRNA;  
4: *CIAPIN1*-siRNA1; 5: *CIAPIN1*-siRNA2;  
6: *CIAPIN1*-siRNA3; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 293 control group or empty plasmid or control-siRNA

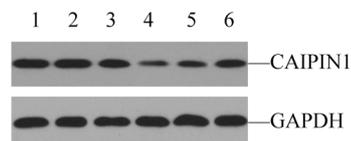


图 4 Western blotting 检测 *CIAPIN1*-siRNA 质粒转染后 MCF-7/ADM 细胞中 *CIAPIN1* 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of *CIAPIN1* protein in MCF-7/ADM cells after transfection with *CIAPIN1*-siRNA detected by Western blotting

1: Control group; 2: Empty plasmid; 3: Control-siRNA;  
4: *CIAPIN1*-siRNA1; 5: *CIAPIN1*-siRNA2; 6: *CIAPIN1*-siRNA3

## 2.4 *CIAPIN1* 基因 RNA 干扰后 MCF-7/ADM 细胞的耐药性发生逆转

MTT 法检测结果(表 2)显示,对 MCF-7/ADM

细胞进行 RNA 干扰后, 紫杉醇、多柔比星和吉西他滨 3 种化疗药物对细胞的 IC<sub>50</sub> 值均有显著的降低 (均  $P < 0.01$ ), 说明针对 *CIAPIN1* 基因进行的 RNAi 干扰可导致肿瘤细胞耐药性发生逆转。

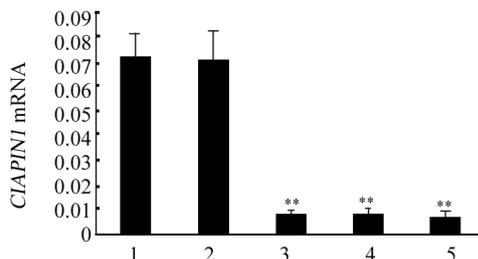


图 5 Lv-CIAPIN1-siRNA1 稳定感染后 MCF-7/ADM 细胞中 *CIAPIN1* mRNA 的表达

Fig. 5 Expression of *CIAPIN1* mRNA in MCF-7/ADM cells after stable infection with Lv-CIAPIN1-siRNA1

1: Control group; 2: Lv-Negative; 3: Lv-CIAPIN1-siRNA1 (first generation); 4: Lv-CIAPIN1-siRNA1 (second generation); 5: Lv-CIAPIN1-siRNA1 (third generation)  
\*\*  $P < 0.01$  vs control group (MCF-7/ADM)

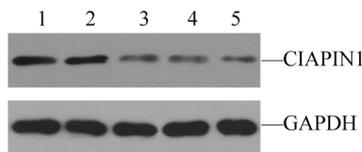


图 6 Lv-CIAPIN1-siRNA1 稳定感染后 MCF-7/ADM 细胞中 *CIAPIN1* 蛋白的表达

Fig. 6 Expression of *CIAPIN1* protein in MCF-7/ADM cells after stable infection with Lv-CIAPIN1-siRNA1

1: Control group; 2: Lv-Negative; 3: Lv-CIAPIN1-siRNA1 (first generation); 4: Lv-CIAPIN1-siRNA1 (second generation); 5: Lv-CIAPIN1-siRNA1 (third generation)

表 2 Lv-CIAPIN1-siRNA1 感染后 MCF7/ADM 细胞对于不同药物的 IC<sub>50</sub> 值 ( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Tab. 2 IC<sub>50</sub> value of different drugs in MCF7/ADM cells after infection with Lv-CIAPIN1-siRNA1 ( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Group	Paclitaxel	Epirubicin	Gemcitabine
MCF7	0.81 ± 0.00	1.07 ± 0.02	5.86 ± 0.55
MCF-7/ADM	7.12 ± 0.31	11.21 ± 1.79	49.72 ± 4.52
MCF7/ADM-Lv-CIAPIN1-siRNA1	1.13 ± 0.06**	4.51 ± 0.20**	18.30 ± 1.27**

\*\*  $P < 0.01$  vs MCF-7/ADM

### 3 讨论

Shibayama 等<sup>[5]</sup>最早证实, *CIAPIN1* 是独立于凋亡调节分子 bcl-2 家族及 caspase 家族之外的 ras 信号转导通路的一个新的调节分子。*CIAPIN1* 基因定位于 16 号染色体长臂, 具有 930 bp 的编码区, 编码蛋白相对分子质量约 37 000。研究<sup>[6]</sup>发现, *CIAPIN1* 广泛分布于胎儿和成人的各种正常组织中, 但表达水平在组织间有差异, 造血器官特别是胎儿肝脏和脾脏中的表达更强一些, 在代谢活跃的组织中含量也会增高。研究<sup>[7-8]</sup>显示, *CIAPIN1* 可能在恶性肿瘤的发生发展中有着重要的作用, 研究<sup>[9]</sup>还发现, 与亲本的胃癌细胞株 SGC7901 相比, 具有 MDR 特性的耐药细胞株 SGC7901/VCR 中的 *CIAPIN1* 在 mRNA 及蛋白表达水平都有明显的上调, 提示 *CIAPIN1* 可能与肿瘤的 MDR 有关。为了深入研究该基因在乳腺癌 MDR 中的作用, 本实验中构建了针对 *CIAPIN1* 基因的慢病毒 RNA 干扰载体, 并将其稳定转染入经 Western blotting 筛选出的高表达 *CIAPIN1* 的乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADM 中, 为后续的研究奠定实验室基础。

RNA 干扰是由双链 RNA 介导的序列特异的转录后基因沉默现象<sup>[10]</sup>。自 1998 年 RNA 干扰被发现以来, 已经广泛应用于基因功能研究和疾病治疗领域<sup>[11]</sup>。本研究设计 siRNA 序列时, 一般认为应考虑 Angela 原则<sup>[12]</sup>的两个问题: 一是所选基因位点相应 siRNA 的抑制效率问题; 二是所选目的基因的稳定性问题。由于人们还不甚了解靶序列 mRNA 上哪一个部位对 siRNA 更为敏感, 通常随机选择 3~4 个靶位点进行 siRNA 设计, 然后筛选出最有效的 siRNA。相对于人工合成的 siRNA, 具有茎环结构的 shRNA 分子有着更高的效率和特异性<sup>[13]</sup>, 其通过载体或逆转录病毒载体、慢病毒载体, 能够长效地抑制靶基因表达。目前常用的载体包括质粒、腺病毒、逆转录病毒、慢病毒及腺相关病毒载体等都含有一个 RNA 聚合酶 III (Poly III) 启动子和一个 4~5 个连续的 T 构成的转录终止位点以及选择标记, 选用 Poly III 启动子是因为此启动子总是在距其一定距离的位置起始转录, 而遇到 4~5 个连续的 T 就终止转录, 并且终止于转录终止位点第二个碱基处, 十分精确。与化学合成及体外酶法合成相比, 表达载体可以在细胞内通过转录持续产生 siRNA, 所以可延长 siRNA 作用时间。本研究采用了慢病毒表达载体介导的 shRNA 来抑制 *CIAPIN1* 基因的表达, 首先利用设计软件对 *CIAPIN1* 全长基因进行了分

析,最终针对其 CDS 区设计了 3 条 shRNA 序列,每条序列中包括两个互补的 DNA 模板单链,中间以 12 个脱氧核苷酸的 loop 结构相连,后面接有 RNA Poly III 聚合酶转录中止位点(TTTT),同时模板链两端分别添加 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。这样的序列转入细胞中后可使转录出的 RNA 链折叠成具发夹结构的小 RNA 分子(shRNA),这些小 RNA 可被细胞内的 Dicer 酶切割为长 21 bp 的 siRNA,从而引起目的基因的沉默。近年来,来源于 HIV 的慢病毒载体因其可感染分裂和非分裂期细胞,且转移基因片段容量较大,目的基因表达时间长受到了高度重视<sup>[14]</sup>。目前慢病毒已被广泛地应用于表达 RNA 干扰的研究中<sup>[15-16]</sup>。本研究成功地将靶基因重组入目的载体,然后在 293TN 细胞中包装生产出无复制性的慢病毒来抑制 *CIAPIN1* 基因。Real-time PCR 检测显示,*CIAPIN1* 的沉默达到了 88% 以上;Western blotting 检测结果表明蛋白水平的抑制高于 83%。免疫荧光观察发现,随着细胞克隆代数增加,GFP 表达未有明显变化,说明稳定表达细胞株中目的基因相对于内参的表达量不随细胞代数的变化而变化。

在以上的基础上,本研究对 RNA 干扰前后 MCF-7/ADM 细胞的耐药性进行了初步检测。本研究中选择的多柔比星,紫杉醇,吉西他滨是乳腺癌化疗中的常用药物,它们均具有 MDR 特性经常被用于乳腺癌 MDR 的研究<sup>[17-18]</sup>。研究结果显示,当 *CIAPIN1* 表达受到抑制后,细胞株对这几种药物的耐药性均显著减弱,证实了 *CIAPIN1* 基因在乳腺癌的 MDR 过程中起着重要的作用。本研究将进一步利用 *CIAPIN1* 基因慢病毒 RNAi 载体建立的良好平台,深入研究该基因在乳腺癌 MDR 中的作用及机制,为临床上寻找有效逆转乳腺癌 MDR 的治疗工具提供新的思路。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 何健荣,高曦,任泽舫. 全球女性乳腺癌和卵巢癌最新发病分布特征 [ J ]. 中国肿瘤, 2009, 18( 3 ): 169-172.
- [ 2 ] 周向荣,刘兴祥,崔林. 每周剂量紫杉醇联合蒽环类药物治疗晚期乳腺癌的临床观察 [ J ]. 实用临床医药杂志, 2010, 14( 3 ): 57-58.
- [ 3 ] Kuo MT. Roles of multidrug resistance genes in breast cancer che-

mo-resistance [ J ]. Adv Exp Med Biol, 2007, 608N: 23-30.

- [ 4 ] Hao Z, Li X, Qiao T, et al. Downregulated expression of *CIAPIN1* may contribute to gastric carcinogenesis by accelerating cell proliferation and promoting cell cycle progression [ J ]. Cancer Biol, 2009, 8( 11 ): 1064-1070.
- [ 5 ] Shibayama H, Takai E, Matsumura I, et al. Identification of a cytokine-induced antiapoptotic molecule anamorsin essential for definitive hematopoiesis [ J ]. Exp Med, 2004, 199( 4 ): 581-592.
- [ 6 ] Hao Z, Li X, Qiao T, et al. Distribution of *CIAPIN1* in normal fetal and adult human tissues [ J ]. Histochem Cytochem, 2006, 54( 4 ): 417-426.
- [ 7 ] Li X, Wu K, Fan D. *CIAPIN1* as a therapeutic target in cancer [ J ]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14( 6 ): 603-610.
- [ 8 ] He J, Wang H, Jin H, et al. *CIAPIN1* inhibits the growth and proliferation of clear cell renal cell carcinoma [ J ]. Cancer Letters, 2009, 276( 1 ): 88-94.
- [ 9 ] Hao Z, Li X, Qiao T, et al. *CIAPIN1* confers multidrug resistance by upregulating the expression of MDR-1 and MRP-1 in gastric cancer cells [ J ]. Cancer Biol Ther, 2006, 5( 3 ): 261-266.
- [ 10 ] Hannon GJ. RNA interference [ J ]. Nature, 2002, 418( 6894 ): 244-251.
- [ 11 ] Sumimoto H, Kawakami Y. The RNA silencing technology applied by lentiviral vectors in oncology [ J ]. Met Mol Biol, 2010, 614( 2 ): 187-199.
- [ 12 ] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [ J ]. Nat Biotechnol, 2004, 22( 3 ): 326-330.
- [ 13 ] 胡燕宾, 聂奎. 发夹 RNA( shRNA )在哺乳动物 RNAi 研究中的应用 [ J ]. 生物技术, 2006, 16( 2 ): 79-82.
- [ 14 ] Liao SS, Ashley SW, Whang EE. Lentivirus-mediated RNA interference of HMGAI promotes chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma [ J ]. Gastrointest Surg, 2006, 10( 9 ): 1254-1262.
- [ 15 ] Zhao Y, Zhang CL, Zeng BF, et al. Enhanced chemosensitivity of drug-resistant osteosarcoma cells by lentivirus-mediated Bcl-2 silencing [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390( 3 ): 642-647.
- [ 16 ] Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways [ J ]. Exp Med, 2007, 204( 1 ): 141-152.
- [ 17 ] 马晓峰, 张莲芬, 屈琳, 等. 化疗药体外干预诱导人乳腺癌细胞产生耐药性的研究 [ J ]. 中国药理学通报, 2009, 25( 11 ): 1456-1459.
- [ 18 ] Niu G, Castro CH, Nguyen N, et al. *In vitro* cytotoxic activity of cationic paclitaxel nanoparticles on MDR-3T3 cells [ J ]. J Drug Target, 2010, 18( 6 ): 468-476.

[ 收稿日期 ] 2011 - 09 - 16

[ 修回日期 ] 2011 - 11 - 19

[ 本文编辑 ] 韩丹