

RNA 干扰抑制 *MDR1* 表达并逆转 Bel7402/5-Fu 肝癌细胞耐药性的研究

任勇亚*

(南京医科大学病理学系, 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究小片段 RNA 干扰对肝癌耐药细胞系 Bel7402/5-Fu 中多药耐药基因 (multidrug resistance 1, *MDR1*) 及其蛋白产物 P-gp 表达的抑制作用和逆转其耐药性的效果。方法: 合成针对 *MDR1* 启动子区域的 RNA 干扰小片段, 转染肝癌耐药细胞 Bel7402/5-Fu。通过 RT-PCR 和 Western blot 方法, 在 mRNA 和蛋白水平评价 RNA 干扰对 *MDR1* 表达的影响。MTT 法检测 RNA 干扰逆转 Bel7402/5-Fu 细胞耐药性的效果, 按实验组和对照组细胞的半数抑制剂量 (IC_{50}) 计算 RNA 干扰对细胞耐药倍数的改变和 RNA 干扰组细胞的耐药逆转倍数。以流式细胞仪比较各组细胞在相同浓度化疗药物作用时细胞的凋亡情况。结果: 在耐药肝癌细胞 Bel7402/5-Fu 中, RNA 干扰明显抑制了 *MDR1* mRNA 和蛋白产物 P-gp 的表达水平, 其表达仅为对照组细胞的 22.55% 和 25.49% ($P < 0.01$)。在相同浓度化疗药物的作用下, RNA 干扰组 Bel7402/5-Fu 细胞凋亡比例显著高于对照组 ($P < 0.01$), 表明细胞耐药性显著下降, 对 5-Fu 的耐药逆转倍数为 14.88 倍。结论: 肝癌耐药细胞 Bel7402/5-Fu 中, RNA 干扰对 *MDR1* mRNA 及其蛋白产物 P-gp 的表达水平有显著抑制作用, 具有良好的逆转耐药性的效果。

[关键词] 多药耐药; RNA 干扰; 肝癌

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)06-0872-05

Suppression of *MDR1* expression and restoration of sensitivity to chemotherapy in multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line Bel7402/5-Fu by RNA interference

REN Yong-ya*

(Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the suppression of *MDR1* and P-glycoprotein induced by small interfering RNA and the restoration of sensitivity to chemotherapeutic drugs in multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line Bel7402/5-Fu. **Methods** *MDR1*-targeted small interfering RNA duplexes were introduced into multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line Bel7402/5-Fu. The suppression of *MDR1* and its gene product P-glycoprotein was examined by RT-PCR and Western blot. MTT assay was performed to measure the reverse effect of small interfering RNA based on the results of IC_{50} . Cell apoptosis was assessed by flow cytometry after various cell lines were treated with chemotherapeutic drugs. **Results** The overexpression of *MDR1* and P-glycoprotein was suppressed efficiently by the introduction of small interfering RNA, which caused sequence-specific gene silence. The level of *MDR1* in the transfected Bel7402/5-Fu cells reduced to 22.55% and P-glycoprotein to 25.49% compared with those of the controls. The apoptosis rate of Bel7402/5-Fu cells increased significantly in the siRNA group during the chemotherapy ($P < 0.01$). Their resistance to

5-Fu was reversed by 14.88 folds, which indicated the restoration of sensitivity to drugs. **Conclusion** Small interfering RNA can inhibit *MDR1* expression effective and reverse the multidrug resistance mediated by P-glycoprotein.

Key words: multidrug resistance; RNA interference; hepatocellular carcinoma

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2006, 31(6):0872-05]

在肝癌化疗过程中,多药耐药(Multidrug resistance, MDR)现象的产生是肝癌细胞抵抗化疗药物的主要机制,原因就是 P-gp 的过度表达^[1]。P-gp 是 *MDR1* 基因的蛋白产物,是一种跨膜磷酸化糖蛋白,能够转运结构和功能各异的化疗药物,从而降低细胞内药物浓度,减轻药物的细胞毒性。P-gp 拮抗剂可以逆转 MDR 现象,但应用于临床化疗可能会导致其它毒副作用,而且它们使耐药肝癌细胞回复对化疗药物敏感的效果不太稳定^[2]。RNA 干扰技术可以有效地诱导靶细胞中特定的内源基因发生基因沉默,丧失正常水平的表达^[3,4]。作者尝试以小片段 RNA 干扰技术抑制 P-gp 在肝癌耐药细胞系 Bel7402/5-Fu 中的表达,从而逆转其 MDR 的表型,期望通过下调 P-gp 介导的 MDR 途径,揭示肝癌多重耐药性产生的分子基础,为临床化疗中遏制肝癌耐药的发生提供安全高效的分子生物学方法。

1 材料与方法

1.1 化疗药物 包括 5-氟尿嘧啶(5-Fu)(旭东海普药厂)、长春新碱(VDS)(杭州民生药厂)、阿霉素(ADR)(浙江海门制药厂)、氨甲喋呤(MTX)(上海华联制药厂)、顺铂(CDDP)(齐鲁制药厂)、紫杉醇(Taxol)(美国 Calbiotech 公司)。以上药品均用生理盐水配成母液,置于 4℃ 低温储存,使用时以培养液稀释至工作浓度,加入细胞培养液中。

1.2 细胞培养 肝癌细胞株 Bel7402 和耐药细胞株 Bel7402/5-Fu 由中国科学院生化细胞所细胞库提供。用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 (GIBCO) 培养液在 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中培养。耐药细胞株 Bel7402/5-Fu 在 1 μmol/L 5-Fu 维持浓度下生长,实验之前 2 周撤去药物,以正常 RPMI 1640 培养液培养,然后用于实验及检测。

1.3 RNA 干扰片段合成和转染 根据 Ambion

公司的设计软件, siRNA 针对 *MDR1* (GenBank 序列号: M14758.1) 启动子, 位于编码区域的 79 ~ 99 号核苷酸 (5'-AAGGAAAAGAAACCAACTGTC-3')。MDR1 siRNA 二聚体的正义链和反义链序列分别为: 5'-GGAAAAGAAACCAACUGUCdTdT-3' 和 3'-dTdTCCUUUCUUUGGUUGACAG-5', 由 Invitrogen 公司合成, 通过 2'-ACE 化学修饰来维持其稳定性。取对数生长期 Bel7402/5-Fu 细胞, Oligofectamine (Invitrogen 公司) 介导 siRNA 转染, siRNA 的浓度均为 200 nmol/L, 在转染 1, 2 和 7 d 后, 收集细胞样品检测基因沉默的效果。

1.4 RT-PCR 检测 *MDR1* 基因的表达 分别取各组细胞 5 × 10⁶ 个, 置于 1 mL Trizol (GIBCO BRL) 中, 充分匀浆, 直至溶液完全透明。按照试剂说明书, 常规方法抽提总 RNA, 用 TaKaRa AMV Reverse Transcriptase XL 将 mRNA 逆转录为 cDNA (2 μg RNA/20 μL 体系), 所得 cDNA 保存于 -80℃。取 2 μL cDNA, 在 20 μL 体系中进行 PCR 反应 (TaKaRa Taq)。MDR1 引物序列: 正义链 5'-ATAT-CAGCAGCCCACATCAT-3'; 反义链 5'-GAAGCACT-GGGATGTCCGGT-3', 产物片段 153 bp。β-actin 引物序列: 正义链 5'-ACTCTTCCAGCCTTCTCTCC-3'; 反义链 5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTGC-3', 产物片段 313 bp。反应条件: 热变性 95℃ 5 min; 35 个循环, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min; 延伸 72℃ 15 min。在 1.5% Agarose (含 0.5 mg/L Ethidium Bromide, EB) 进行电泳, Quantity One (BIO-RAD) 软件对各电泳条带的光密度进行半定量分析。

1.5 Western 印迹检测 P-gp 的表达水平 取各组细胞 5 × 10⁶ 个, 置于 1 mL 蛋白裂解液充分裂解, 直至裂解液完全澄清。Bradford 法测定样品中的蛋白含量, 将所有样品的蛋白含量稀释至等浓度。取 50 μg 蛋白样品与上样液混匀, 沸水浴 15 min, 上样至 8% 的 SDS-PAGE, 10 mA 电泳约 4 h。电泳完毕, 取下凝胶, 蛋白条带电转膜至硝酸纤维素膜, 80 V 约 2 h, 硝酸纤维素膜置于封闭液中,

4℃过夜。次日,分别加入鼠抗人 P-gp (1:1 000, 美国 Calbiochem 公司)和鼠抗人 β -actin (1:2 000, NeoMarker Inc);然后再加生物素化二抗,碱性磷酸酯酶联三抗(美国 Vector 公司),摇床震荡 1.5 h,充分反应,使之互相结合,最后加入显色底物 NBT-BCIP,在酶催化作用下,显色于硝酸纤维素膜。通过 Quantity One (BIO-RAD) 软件对各组条带扫描拍照;并对其光密度值进行半定量分析。

1.6 MTT 法检测细胞耐药逆转情况 指数生长期的肝癌细胞株 Bel7402 和耐药细胞株 Bel7402/5-Fu 常规消化后,用含 5% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释,按 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板,培养 24 h,使细胞贴壁良好。之后的 24 h 内,Bel7402/5-Fu 细胞 siRNA 实验组,进行 MDR1 的 siRNA 转染;Bel7402/5-Fu 细胞对照组和 Bel7402 细胞继续常规培养。随后各组细胞均换入新鲜的培养液,并加入不同浓度的 5-Fu, VDS, ADR, MTX, CDDP 和 Taxol,每种药物 8 个等比稀释剂量组,6 孔/组,并设 6 孔不加药的平行对照孔。继续培养 72 h 后,去除含药培养液,再换以新鲜培养液培养 48 h。最后细胞中加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μ L,培养 4 h 后离心弃上清,加入 200 μ L DMSO/孔,震荡溶解沉淀,酶标仪在波长 490 nm 下读取吸光度值。计算细胞生长抑制率[细胞生长抑制率 = (对照孔吸光度 - 药物处理孔吸光度)/对照孔吸光度 \times 100%]和不同化疗药物对各组细胞的半数抑制剂量 (IC_{50})。进一步计算 Bel7402/5-Fu 细胞 siRNA 实验组的耐药逆转倍数(耐药逆转倍数 = Bel7402/5-Fu 细胞对照组的耐

药倍数/siRNA 实验组细胞的耐药倍数)。

1.7 流式细胞仪检测 按各组化疗药物对 Bel7402 细胞的 IC_{50} 浓度,加入对数生长期的各组细胞中,培养 48 h 后换入新鲜培养液,再培养 48 h。各组细胞的胰蛋白酶消化产物合并培养液上清共同离心(1 500 r/min, 10 min),所得细胞进行流式细胞仪(FACS Calibur)检测。

1.8 统计学处理 所有检测实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 t 检验方法对数据进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示具有统计学的显著差异,数据统计分析使用软件为 SPSS 11.0 软件包。

2 结果

2.1 MDR1 基因在 mRNA 水平的表达 MDR1 基因的 RT-PCR 产物电泳图谱显示,在经过 siRNA 转染的肝癌耐药细胞株 Bel7402/5-Fu 中,转染后的第 1 天和第 2 天,MDR1 基因在 mRNA 水平的表达有显著下降,仅为对照组 Bel7402/5-Fu 细胞的 22.55% ($P < 0.01$)。但在第 7 天时,又基本回升至原始状态(图 1)。

2.2 P-gp 在蛋白水平的表达 经 Western blot 检测发现在肝癌耐药细胞株 Bel7402/5-Fu 中,MDR1 基因的蛋白表达产物 P-gp 与 MDR1 基因在 mRNA 水平的变化趋势完全相同。经过 siRNA 转染之后,在第 1 天和第 2 天时,P-gp 的表达有显著下降,仅为对照组 Bel7402/5-Fu 细胞的 25.49% ($P < 0.01$)。但在第 7 天时,基本回升至原始状态,表达水平和对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。

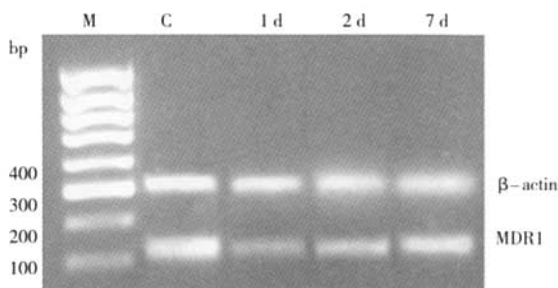


图 1 MDR1 基因的表达 M: DNA 分子量标志; C: 对照组 Bel7402/5-Fu 细胞; 1, 2, 7 d: 分别为经过 siRNA 处理之后 1, 2, 7 d 的 Bel7402/5-Fu 细胞

Fig. 1 Expression of MDR1 gene M: DNA molecular marker; C: Bel7402/5-Fu cells in control group; 1, 2, 7 d: Bel7402/5-Fu cells incubated with siRNA for 1, 2 and 7 days respectively

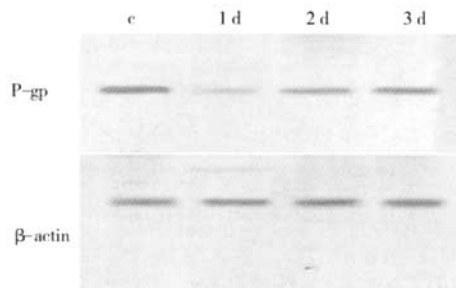


图 2 P-gp 蛋白的表达水平 C: 对照组 Bel7402/5-Fu 细胞; 1, 2, 7 d: 分别为经过 siRNA 处理之后 1, 2, 7 d 的 Bel7402/5-Fu 细胞

Fig. 2 Expression of P-gp at protein level C: Bel7402/5-Fu cells in control group; 1, 2, 7 d: Bel7402/5-Fu cells incubated with siRNA for 1, 2 and 7 days respectively

2.3 MDR1 基因的 siRNA 对细胞耐药的逆转情况

通过荧光标记的 RNA 片段,观察到在本研究的转染条件下,转染效率在 50% 左右。siRNA 对 MDR1 基因表达和 P-gp 的抑制作用有效逆转了 Bel7402/5-Fu 细胞的 MDR 现象。使它对各种化疗药物的敏感性显著增强,与最初的 Bel7402 细胞相比,耐药倍数明显下降 ($P < 0.01$)。其中最显著的是 5-Fu 和 Taxol,MDR1 基因的 siRNA 转染 Bel7402/5-Fu 细胞,可以造成这 2 种药物的耐

药逆转倍数分别达到 14.88 和 21.07(表 1)。

2.4 细胞凋亡率

按各化疗药物对 Bel7402 细胞的 IC₅₀ 浓度,对各组对数生长期的细胞进行处理。对照组 Bel7402/5-Fu 细胞的凋亡率与未加药时比较,基本没有明显改变 ($P > 0.05$);而 siRNA 实验组的 Bel7402/5-Fu 细胞的凋亡率在此浓度下有显著上升 ($P < 0.01$),一般达到对照组细胞的 3~4 倍左右(表 2)。

表 1 各组细胞对化疗药物的 IC₅₀ 和耐药倍数($\bar{x} \pm s$)

化疗药物	IC ₅₀ (μmol/L)		耐药倍数		Bel7402/5-Fu (siRNA) 耐药逆转倍数	
	Bel7402	Bel7402/5-Fu (Control)	Bel7402/5-Fu (Control)	Bel7402/5-Fu (siRNA)		
5-Fu	30.00 ± 6.00	3050.00 ± 430.00**	205.00 ± 35.00##	101.67 ± 14.33	6.83 ± 1.17##	14.88 ± 2.10
VDS	0.06 ± 0.01	2.73 ± 0.71**	0.84 ± 0.16##	44.75 ± 11.64	13.77 ± 2.62##	3.25 ± 0.85
ADR	0.18 ± 0.04	3.51 ± 0.95**	0.67 ± 0.18##	19.50 ± 5.28	3.72 ± 1.00##	5.24 ± 1.42
MTX	98.40 ± 12.40	100.60 ± 9.31	0.10 ± 7.90	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.08	1.00 ± 0.09
CDDP	5.33 ± 1.67	23.40 ± 3.90**	10.60 ± 1.80##	4.39 ± 0.73	1.99 ± 0.34##	2.21 ± 0.37
Taxol	0.05 ± 0.01	2.16 ± 0.84**	0.15 ± 0.06##	40.75 ± 15.85	2.83 ± 1.13##	14.40 ± 5.60

与 Bel7402 相比, ** $P < 0.01$; 与 Bel7402/5-Fu (Control) 相比, ## $P < 0.01$

表 2 各组细胞的凋亡率($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	5-Fu	VDS	ADR	MTX	CDDP	Taxol
Bel7402	20.7 ± 3.2	16.9 ± 4.0	24.7 ± 5.2	15.1 ± 3.8	22.4 ± 4.5	21.4 ± 3.9
Bel7402/5-Fu (Control)	5.0 ± 1.1**	4.8 ± 0.9**	5.1 ± 1.2**	15.4 ± 2.5	4.9 ± 0.8**	5.0 ± 1.4**
Bel7402/5-Fu (siRNA)	18.1 ± 4.5##	15.1 ± 3.8##	21.0 ± 4.0##	15.0 ± 3.4	16.2 ± 4.5##	18.5 ± 4.4##

与 Bel7402 相比, ** $P < 0.01$; 与 Bel7402/5-Fu (Control) 相比, ## $P < 0.01$

3 讨 论

P-gp 在人类的多种肿瘤中出现,与肿瘤的 MDR 现象密切相关。一些肿瘤是在治疗之前,形成肿瘤的组织自身就有 P-gp 的表达;另一些则是在化疗之后,肿瘤细胞经过化疗药物的诱导和筛选作用,逐渐在患者的肿瘤组织中由 P-gp 高表达的细胞占据了主导地位。若能遏制 P-gp 蛋白的功能,即可以提升具有 MDR 表型的肿瘤细胞对化疗药物的敏感程度。

研究显示,向哺乳动物细胞中导入特定的 21 个寡聚核苷酸 siRNA 片段,就可以启动细胞中的 RNA 干扰机制^[5]。它由双链 RNA 产生,通过进化过程中极度保守的转录后基因沉默,诱导互补的 mRNA 发生降解反应,使同源基因表达被抑制^[6]。而且,它仅仅特异性阻断 siRNA 片段序列来源的

基因,对其他无关基因没有任何影响^[5]。本研究表明,在 siRNA 实验组 Bel7402/5-Fu 细胞中,MDR1 siRNA 对 MDR1 的基因沉默效应具有特异性,它的转染对细胞内 β-actin 等管家基因的表达没有丝毫的干扰作用。分子生物学检测结果显示,通过 MDR1 siRNA 的二聚体转染,可以有效逆转 Bel7402/5-Fu 细胞的 MDR 现象,显著下调 MDR1 基因和 P-gp 蛋白的表达水平,加强了由 P-gp 介导和转运的化疗药物在细胞内的累积,在一定程度上恢复了 Bel7402/5-Fu 细胞的化疗敏感性。在每个细胞中,仅需要少量拷贝的 siRNA 片段就可以起到非常好的干扰作用,在各个器官组织中的效果都较为稳定,因而拥有广泛的适用性和潜在的临床应用价值。

不过,在 mRNA 和蛋白水平的检测中发现,

siRNA 实验组 Bel7402/5-Fu 细胞中,即使在 siRNA 作用效果最强的第 1 天和第 2 天,仍有少量 *MDR1* 基因和 P-gp 蛋白存在,而不是完全被清除。可能是由于产生 MDR 现象的 Bel7402/5-Fu 细胞本身 P-gp 表达旺盛,含量较高,而 P-gp 蛋白代谢的半衰期较长,一般可以达到 15 h 左右^[7]。此外,还可能与 siRNA 转染细胞发挥基因沉默作用的效率有关。文献报道,化学合成的 siRNA 片段的作用有效时限在细胞中较为短暂^[8]。本实验也显示,在 siRNA 作用的 2 d 之内,抑制效果达到最大值,随后目标基因的表达即开始回升;转染 7 d 之后, Bel7402/5-Fu 细胞内 *MDR1* 的表达和 P-gp 蛋白的合成又回复到原来的水平。所以,作者计划在今后研究中使用 DNA 载体,如质粒或者复制缺陷型病毒,携带 *MDR1* siRNA 基因进入细胞内,使其得以长期稳定表达,便于深入探讨 *MDR1* siRNA 的长期干扰对耐药肝癌细胞 MDR 表型的作用。

根据 siRNA 实验组 Bel7402/5-Fu 细胞对各种化疗药物的 IC₅₀ 浓度以及 siRNA 作用之后细胞耐药倍数的变化情况,作者认为尽管 siRNA 抑制 *MDR1* 基因的效率很高,可以降低细胞的耐药倍数,但它不可能彻底消除 Bel7402/5-Fu 细胞的 MDR 表型。除了前述的 P-gp 蛋白半衰期和 siRNA 的时效性外,另一个重要原因就是肝癌细胞的 MDR 现象是由多种基因和多条途径共同造成的,并不可能单靠阻断其中一条途径就达到非常理想的结果^[9]。

本次研究针对 *MDR1* siRNA 对 *MDR1* 基因专一而高效遏制,从而逆转肝癌耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的 MDR 状况进行了初步探讨。当然,对肝癌 MDR 的控制仍然是化疗研究的重要课题,有待于新兴的化学药物和生物基因治疗的发展。

参考文献:

- [1] Levchenko A, Mehta B M, Niu X, et al. Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(6): 1933-1938.
- [2] Rosenberg M F, Callaghan R, Modok S, et al. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state [J]. J Biol Chem, 2005, 280(4): 2857-2862.
- [3] Huppi K, Martin S E, Caplen N J. Defining and assaying RNAi in mammalian cells [J]. Mol Cell, 2005, 17(1): 1-10.
- [4] 吕辉,贺智敏. RNA 干扰技术的演进及其在基因功能和基因治疗中的应用 [J]. 中南大学学报(医学版), 2005, 30(1): 102-105.
- [5] Elbashir S M, 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.
- [6] Hannon G J. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.
- [7] Yu G, Ahmad S, Aquino A, et al. Transfection with protein kinase C α confers increased multidrug resistance to MCF-7 cells expressing P-glycoprotein [J]. Cancer Commun, 1991, 3(6): 181-189.
- [8] Gillet J P, Efferth T, Steinbach D, et al. Microarray-based detection of multidrug resistance in human tumor cells by expression profiling of ATP-binding cassette transporter genes [J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8987-8993.
- [9] Novina C D, Murray M F, Dykxhoorn D M, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection [J]. Nat Med, 2002, 8(7): 681-686.

(本文编辑 傅希文)