

## · 实验研究 ·

# 小分子干扰 RNA 联合反义脱氧寡核苷酸靶向逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 多药耐药的研究

魏军民 侯明 李丽珍 孔峰 高鹏

**【摘要】 目的** 探讨针对多药耐药基因(MDR-1)的小分子干扰 RNA(siRNAs)和反义脱氧寡核苷酸(asODNs)联合应用逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 的作用效果。**方法** 设计并合成针对 MD-1 基因同一序列的 siRNAs 和 asODNs 及阴性对照 siRNAs,采用转染试剂 lipofectamine<sup>TM</sup>2000 分别转染人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR;利用 RT-PCR 检测 MD-1 mRNA 和 Western blot 检测 MD-1 蛋白质的表达;采用罗丹明 123 外排实验检测 P-gp 的转运功能,MTT 法检测 MCF-7/ADR 细胞对阿霉素的耐药逆转效果。**结果** siRNAs、asODNs、asODNs 和 siRNAs 联合应用均能降低 MD-1 mRNA 及其蛋白质表达,提高 P-gp 的转运功能,使细胞对阿霉素的敏感性明显恢复;asODNs 和 siRNAs 联合应用效果明显提高;低浓度 siRNAs(200 nmol/L)比高浓度 asODNs(5  $\mu$ mol/L)的效果强。**结论** siRNAs、asODNs 能有效逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 的多药耐药,asODNs 和 siRNAs 联合应用效果明显加强。

**【关键词】** 小分子干扰 RNA; 反义脱氧寡核苷酸; 基因; MD-1; 抗药性; 肿瘤

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标识码】** A

**Reversal of multidrug resistance of human breast cancer MCF-7/ADR cells by small interfering RNAs combined with antisense oligodeoxyribonucleotides for inhibition of MD-1 gene expression** WEI Jun-min, HOU Ming, LI Li-zhen, KONG Feng, GAO Peng. Cancer Center, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China

**【Abstract】 Objective** To study the effect of small interfering RNAs (siRNAs) combined with antisense oligodeoxyribonucleotides (asODNs), which targeted MD-1 gene, on reversing multidrug resistance of human breast cancer cell line MCF-7/ADR. **Methods** The siRNAs and asODNs which targeted the same sequences of MD-1 gene were designed and synthesized. Human breast cancer MCF-7/ADR cells were cultured and transfected with asODNs, siRNAs + asODNs, siRNAs, and negative siRNAs using lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, respectively. MD-1 mRNA was assayed by RT-PCR and the protein expression was detected by Western blotting. The function of P-glycoprotein (P-gp) was detected by rhodamine 123 retention and the resistant efficiency of MCF-7/ADR to ADM was determined by MTT method. **Results** The expressions of MD-1 mRNA and protein decreased significantly after transfection of asODNs, siRNAs + asODNs, and siRNAs respectively. The transporting function of P-gp increased and the resistance of MCF-7/ADR to ADM reversed significantly.

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院肿瘤中心(魏军民,侯明,李丽珍);山东大学医学院分子生物学教研室(孔峰);山东大学医学院病理教研室(高鹏)

The reversing effect increased significantly by siRNAs combined with asODNs. The inhibition effect of the siRNAs with lower concentration (200 nmol/L) was greater than that of asODNs with higher concentration (5  $\mu$ mol/L). **Conclusion** siRNAs and asODNs could reverse multidrug resistance of human breast cancer cell line MCF-7/ADR. The inhibition effect is increased significantly by siRNAs combined with asODNs.

**【Key words】** SiRNAs; Antisense oligodeoxyribonucleotides; Gene; MDR-1; Drug resistance; Neoplasm

化疗是目前恶性肿瘤的主要治疗手段之一,而多药耐药是导致化疗失败的主要原因。多药耐药基因(multirug resistance 1,MDR-1)表达增高可导致多药耐药的产生,其编码蛋白位于细胞膜上的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)。P-gp 能将细胞内化疗药物泵出细胞外,降低细胞内药物的浓度,减弱化疗药物的杀伤作用<sup>[1]</sup>。如何逆转 MDR-1 成为当前肿瘤研究的热点之一。基因治疗作为靶向治疗的手段,已用于逆转 MDR-1 的研究。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)作为基因沉默的方法,已成功的用于肿瘤基因功能和基因治疗的研究<sup>[2]</sup>。本试验研究化学合成的短链小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNAs)和针对相同序列的反义脱氧寡核苷酸(antisense oligodeoxyribonucleotides, asODNs)联合应用靶向逆转 MDR-1 的作用效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 siRNAs 和 asODNs 的设计与合成

根据 siRNAs 的设计原则<sup>[3]</sup>,采用 MDR-1 的基因序列 503 ~ 523 (GenBank 号:NM-000927)为靶目标。MDR-1 的 siRNAs 靶序列为 5'-AAGAAGGAAAAGAAACCAACU-3', siRNAs 正义链为 5'-GAAGGAAAAGAAACCAACUdTdT-3',反义链 5'-AGUUGGUUUCUUU UCCUUCdTdT -3';并利用无关序列作为阴性对照,阴性对照 siRNAs 正义链为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGdTdT-3',反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3',siRNAs 化学合成由上海联合基因科技有限公司提供。并化学合成同一靶序列 asODNs,碱基序列为 5'-AGTTGGTTTCTTTTCCTTC-3',行硫代磷酸化修饰,由上海生工生物工程公司提供。

### 1.2 细胞培养及转染

耐阿霉素的人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 株由山东大学医学院病理学教研室惠赠(来源于美国国立肿瘤研究所),本室常规传代培养,培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 (Gibco 公司产品),试验前无药培养 2 周,取对数生长期的细胞进行试验。按转染试剂 lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen 公司)的说明优化转染条件,加入作用物 48 h 后收获细胞。试验分 5 组:A 对照组,只加转染试剂;B asODNs 组,作用浓度为 5  $\mu$ mol/L;C asODNs(作用浓度为 5  $\mu$ mol/L)

+ siRNAs (作用浓度为 200 nmol/L) 组; D siRNAs 组, 作用浓度为 200 nmol/L; E 阴性对照 siRNAs 组, 作用浓度为 200 nmol/L。

### 1.3 RT-PCR 检测 MDR-1 mRNA

用 Trizol 试剂盒(Gibco 公司产品)抽提细胞总 RNA, 电泳鉴定, 紫外光分光光度计定量。取 2.0  $\mu$ g 总 RNA, 以 TAKARA 公司的 Random 9 mers 为引物进行逆转录反应。反应条件为 30  $^{\circ}$ C 10 min, 55  $^{\circ}$ C 30 min, 99  $^{\circ}$ C 5 min, 5  $^{\circ}$ C 5 min, 随后进行 30 个循环的 PCR 扩增。MDR-1 上游引物: 5'-ACTGAGCCTGCAGGTGAAGA-3', 下游引物: 5'-CCACCAGAGAGCTGAGTTCC-3', 扩增产物为 396 bp。以  $\beta$ -actin 为内参照, 上游引物: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 下游引物: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3', 扩增产物为 539 bp。取扩增产物进行 2% 凝胶电泳, 凝胶图像分析仪分析, MDR-1 指数 = MDR-1 值/ $\beta$ -actin 值。试验重复 3 遍, 取平均值。

### 1.4 Western blot 检测 MDR-1 蛋白的表达

利用收集的细胞提取总蛋白, 取 30  $\mu$ g 蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶室温封闭 2 h; 加入 MDR-1 单克隆抗体(1:500, Neomarks 公司)于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 再浸于 1:1000 二抗(Sigma 公司)中, 室温 1 h, 将膜放入显色液中显色拍照。以  $\beta$ -actin 等量蛋白质上样作为对照。用 Image J 分析软件进行分析。

### 1.5 罗丹明 123 外排实验检测 P-gp 的转运功能

罗丹明 123(Sigma 公司)是 P-gp 特异性转运的荧光物质。当细胞的 P-gp 合成减少时, 罗丹明 123 外排功能降低, 其在细胞内的聚集增加, 荧光强度高于耐药细胞。借助罗丹明 123 外排检测试剂盒中的微囊泡使罗丹明 123 进入细胞内, 用流式细胞术检测细胞内罗丹明 123 的荧光强度。实验重复 3 遍, 取平均值。

### 1.6 MTT 法检测耐药逆转效果

细胞中加入终浓度为 1  $\mu$ mol/L 的多柔比星, 常规 MTT 法检测试验细胞和耐药细胞的生存率(TCL), 在酶标仪上以 570 nm 和 630 nm 双波长检测吸光度 A 值。终吸光度 A 值 =  $A_{570\text{ nm}} - A_{630\text{ nm}}$ ,  $\text{TCL} = A_{\text{加药}}/A_{\text{对照}} \times 100\%$ 。实验重复 3 遍, 取平均值。

### 1.7 统计学方法

利用 SPSS10.0 统计学软件进行处理, 进行  $t$  检验和方差分析。

## 2 结果

### 2.1 MDR-1 mRNA 的变化

耐药细胞的 MDR-1 指数为  $0.92 \pm 0.09$ 。转染 asODNs、asODNs + siRNAs 组、siRNAs 组、siRNAs 阴性对照组的 MDR-1 指数分别为  $0.71 \pm 0.06$ 、 $0.16 \pm$

0.03、 $0.31 \pm 0.08$ 、 $0.94 \pm 0.11$ 。其中转染 asODNs 组、asODNs + siRNAs 组、siRNAs 组的实验细胞与耐药细胞的 MDR-1 指数差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 阴性对照 siRNAs 组与耐药细胞的 MDR-1 指数差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); asODNs + siRNAs 组与 asODNs、siRNAs 组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); siRNAs 组与 asODNs 组比较,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 1)。

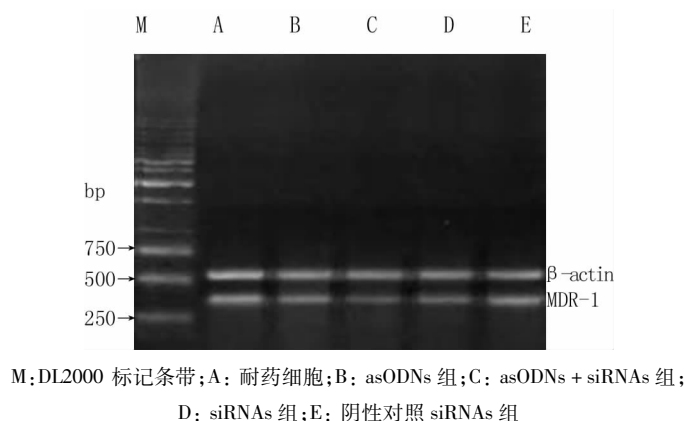
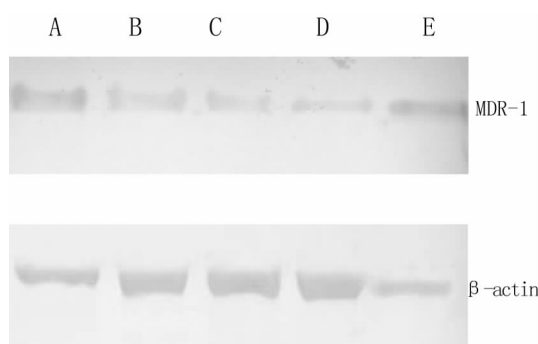


图 1 实验细胞 MDR-1 mRNA 的表达

## 2.2 MDR-1 蛋白的表达

Western blot 检测实验细胞 MDR-1 蛋白的表达,其中转染 asODNs 组、asODNs + siRNAs 组、siRNAs 组的实验细胞与耐药细胞的 MDR-1 蛋白表达比较均有明显降低( $P < 0.05$ ),以 asODNs + siRNAs 组降低明显,siRNAs 阴性对照组 MDR-1 蛋白表达无明显变化( $P > 0.05$ )(图 2)。



A: 耐药细胞; B: asODNs 组; C: asODNs + siRNAs 组;  
D: siRNAs 组; E: 阴性对照 siRNAs 组

图 2 Western blot 检测 MDR-1 蛋白的表达

## 2.3 P-gp 转运功能的变化

流式细胞术结果显示耐药细胞相对荧光强度为( $14 \pm 2$ )%,转染 asODNs、

asODNs + siRNAs、siRNAs、阴性对照 siRNAs 的实验细胞荧光强度分别为  $(35 \pm 5)\%$ 、 $(81 \pm 6)\%$ 、 $(65 \pm 4)\%$ 、 $(20 \pm 3)\%$ 。其中:阴性对照 siRNAs 与耐药细胞相对荧光强度的差异无统计学意义( $P > 0.05$ );转染 asODNs、asODNs + siRNAs、siRNAs 实验细胞与耐药细胞相对荧光强度的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );asODNs + siRNAs 与 asODNs 和 siRNAs 比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );siRNAs 与 asODNs 比较,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 2.4 耐药逆转效果

加入终浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  的多柔比星作用后,耐药细胞存活率为  $(75 \pm 4)\%$ ,转染 asODNs、asODNs + siRNAs、siRNAs、阴性对照 siRNAs 的实验细胞存活率分别为  $(56 \pm 3)\%$ 、 $(19 \pm 2)\%$ 、 $(32 \pm 2)\%$ 、 $(69 \pm 3)\%$ 。其中:阴性对照 siRNAs 与耐药细胞 TCL 的差异无统计学意义( $P > 0.05$ );asODNs、asODNs + siRNAs、siRNAs 实验细胞与耐药细胞 TCL 的差异有统计学意义( $P < 0.05$ );asODNs + siRNAs、siRNAs 与 asODNs 实验细胞比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );asODNs + siRNAs 与 siRNAs 比较,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

多药耐药的产生是影响恶性肿瘤化疗疗效的主要因素。MDR-1 基因产生的 P-gp 过表达导致多药耐药的发生。体外实验中许多小分子的药物如维拉帕米、环孢素 A 等具有逆转多药耐药的作用,但在临床上由于用药剂量大所产生的严重毒副作用限制了其应用。目前针对 MDR-1 基因的研究取得了一定的进展。反义技术(antisense approach)逆转 MDR-1 已有较为广泛和深入的实验研究<sup>[4-5]</sup>。asODNs 作为一种反义技术,可与目的基因的双螺旋 DNA 结合,形成局部的分子间三链,干扰核蛋白因子、聚合酶与 DNA 结合,在转录水平上抑制靶基因表达。已有实验证实 asODNs 可封闭 MDR-1 基因的表达。

1998 年,Fire 等<sup>[6]</sup>将外源双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)导入优美新小杆线虫(caenorhabditis elegans)体内,发现虫体内与 dsRNA 同源的基因表达被抑制。作者将此现象称为 RNAi。随着研究深入,学者们发现 dsRNA 在细胞内降解成 21 ~ 25 nt 的核苷酸后发挥着重要的作用,而体外合成的小分子 dsRNA 更能直接引起 RNAi。这些小分子的 dsRNA 被称之为 siRNAs。后来的发现证实了 siRNAs 在哺乳动物细胞 RNAi 起主要作用<sup>[7]</sup>。目前 RNAi 作为“基因敲除”的新方法已成功的用于病毒学和肿瘤学的研究,而且发现 siRNAs 在极低浓度的情况下就能特异性封闭 mRNA 的表达。Nieth 等<sup>[8]</sup>应用 RNAi 技术,设计针对 MDR-1mRNA 的 siRNAs 并将其转入人胰腺癌细胞和胃癌细胞中,结果 siRNAs 可特异性抑制 MDR-1 在 mRNA 和蛋白质水平的表达,

使其下降至 91%。实验证实 siRNAs 可特异逆转 MDR-1 介导的耐药。

本试验将针对 MDR-1 基因的 siRNAs 转入耐阿霉素的人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 中,同时合成针对相同序列的 asODNs,分别单独应用和联合应用。结果发现,siRNAs 在较低浓度(nmol 水平)即能较好地封闭 MDR-1 基因,mRNA 和 P-gp 表达水平明显下降,P-gp 转运功能随之降低,MCF-7/ADR 细胞对阿霉素的敏感性明显恢复。asODNs 也具有一定的封闭 MDR-1 基因的作用,但明显较 siRNAs 作用弱。siRNAs 联合 asODNs 作用明显加强,与单用 siRNAs 或 asODNs 比较,差异有统计学意义。实验结果初步证实 siRNAs 联合 asODNs 应用可增强封闭 mRNA 的作用。

有关 siRNAs、asODNs 沉默基因表达效果比较的研究较少,且结论不一。Bertrand 等<sup>[9]</sup>应用针对不同靶序列的 siRNAs 和 asODNs 抑制 Hela 细胞的绿色荧光蛋白表达,结果发现低浓度 siRNAs 较高浓度 asODNs 作用强。而 Lou 等<sup>[10]</sup>应用针对两段相同靶序列的 siRNAs 和 asODNs 抑制 T24 细胞的 RAF-1mRNA,结果发现相同剂量的 siRNAs 和 asODNs 抑制 RAF-1mRNA 及蛋白质表达的差别不明显。本实验结果发现低浓度 siRNAs 比高浓度同一靶目标的 asODNs 抑制作用强,且二者联合应用作用增强。理论上,asODNs 主要作用于转录前,而 siRNAs 主要作用于转录后,二者联合应用具有可行性。目前尚无 siRNAs 和 asODNs 联合应用的文献报道。

本研究结果初步证明 siRNAs 单独和联合应用 asODNs 可逆转 MDR-1。其作为一种基因治疗方法有望为解决多药耐药提供新的治疗手段。

#### 参考文献

- [1] Gottesman M M, Pastan I, Ambudkar S V. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev*,1996,6:610 – 617.
- [2] Rye P D, Stigbrand T. Interfering with cancer: a brief outline of advances in RNA interference in oncology. *Tumour Biol*, 2004,25:329 – 336.
- [3] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, *et al.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*,2002,26:199 – 213.
- [4] Chan J Y, Chu A C, Fung K P. Inhibition of P-glycoprotein expression and reversal of drug resistance of human hepatoma HepG2 cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense RNA. *Life Sci*,2000,67:2117 – 2124.
- [5] Stuart D D, Kao G Y, Allen T M. A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Therapy*,2000,7:466 – 475.
- [6] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*,1998,391:806 – 811.
- [7] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science*,1999,286:950 – 952.
- [8] Nieth C, Prietsch A, Stege A, *et al.* Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett*,2003,545:144 – 150.
- [9] Bertrand J R, Pottier M, Vekris A, *et al.* Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*.

Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296: 1000 - 1004.

- [10] Lou T F, Gray C W, Gray D M. The reduction of Raf-1 protein by phosphorothioate ODNs and siRNAs targeted to the same two mRNA sequences. Oligonucleotides, 2003, 13: 313 - 324.

(收稿日期: 2008-06-10)

(本文编辑: 陈莉)

魏军民, 侯明, 李丽珍, 等. 小分子干扰 RNA 联合反义脱氧寡核苷酸靶向逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 多药耐药的研究 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(4): 436 - 442.