

李旭艳,邵淑丽,张伟伟,等. 质粒介导的 RNAi 沉默 *mdr1* 基因增强白血病耐药细胞 HT9 对姜黄素的敏感性[J]. 江苏农业科学,2014,42(1): 22-25.

质粒介导的 RNAi 沉默 *mdr1* 基因增强白血病 耐药细胞 HT9 对姜黄素的敏感性

李旭艳,邵淑丽,张伟伟,恽东泽,付 博,张珍珠

(齐齐哈尔大学,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:通过 pSilencer 2.1 质粒介导的 RNAi 技术沉默急性早幼粒白血病耐药 HT9 细胞的耐药基因 *mdr1* 表达,可提高耐药细胞对姜黄素的敏感性。通过设计合成靶向 *mdr1* 基因的 shRNA 干扰片段,定向克隆到 pSilencer 2.1-U6 neo 质粒中,成功构建沉默 *mdr1* 基因特异表达的 shRNA 表达载体,电转染 HT9 细胞后筛选阳性克隆扩大培养。采用实时荧光定量 PCR、Western blot 检测细胞 *mdr1* 基因表达情况,流式细胞术检测 *P*-糖蛋白外排泵功能,MTT 法和流式细胞技术检测细胞对药物敏感性和细胞周期分布。结果显示,构建的 shRNA 表达载体 pU6/shRNA/*mdr1* 转染 HT9 细胞后,HT9/pU6/shRNA 细胞 *mdr1* mRNA 表达降低了 78.84% ($P < 0.01$),*P*-糖蛋白的表达量降低了 48.27% ($P < 0.05$),细胞内 Rho123 相对荧光强度由 $10.8\% \pm 0.58\%$ 升高至 $73.56\% \pm 1.37\%$;转染细胞对姜黄素敏感性明显增强, IC_{50} 由 $(24.10 \pm 0.83) \mu\text{mol/L}$ 降至 $(5.10 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$;耐药相对逆转率为 $84.74\% \pm 1.86\%$,与 HT9 细胞相比,经姜黄素处理的稳定转染细胞 HT9/pU6/shRNA 细胞周期阻滞在 S、G2/M 期。说明质粒介导的 shRNA 表达载体 pU6/shRNA/*mdr1* 能够稳定、持久地抑制 *mdr1* 基因表达,能有效增强 HT9 细胞对姜黄素的敏感性。

关键词:shRNA;pSilencer 2.1-U6 neo 质粒;多药耐药性;HT9 细胞;姜黄素

中图分类号:R961 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0022-04

近年来,白血病的治愈率已有明显提高,但由于白血病细胞中存在多种耐药相关基因异常的高表达,致使白血病细胞对抗癌药物产生耐药性,导致部分白血病患者治疗失败或在化疗后复发。研究表明,多药耐药基因 *mdr1* 的过表达成为经典的多药耐药表型^[1-2]。*mdr1* 基因的表达产物 *P*-糖蛋白(*P*-glycoprotein,*P*-gp)可以利用 ATP 水解释放的能量将化疗药物泵出细胞外,使细胞内药物浓度始终维持在低水平,使药物的细胞毒作用减弱,从而导致细胞产生耐药性^[1]。*P*-糖蛋白对药物的特异性很小,能够运输多种结构不同的底物,如长春新碱、蒽环类药物(柔红霉素、阿霉素)、姜黄素、紫杉醇等,因此耐药细胞能对许多结构和作用机制不同的药物产生耐性。目前,RNA 干扰(RNA interference,RNAi)已用于沉默肿瘤细胞耐药基因表达,增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[3-4]。本试验以质粒 pSilencer 2.1-U6 neo 为基础,成功构建了 shRNA 表达载体 pU6/shRNA/*mdr1*,转染早幼粒白血病耐药 HT9 细胞,观察细胞 *mdr1* 基因表达情况、蛋白功能及细胞对姜黄素敏感性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2013-06-06

基金项目:黑龙江省自然科学基金(编号:C200624);黑龙江省教育厅科技项目(编号:11511447,12511611)。

作者简介:李旭艳(1982—),女,山东阳谷人,硕士,讲师,从事分子生物学研究。Tel:(0452)2742695;E-mail:lx0702@126.com。

通信作者:邵淑丽,博士,教授,从事分子生物学研究。Tel:(0452)2738219;E-mail:shshl32@163.com。

pSilencer 2.1-U6 neo 由北京鼎国生物技术有限责任公司惠赠,人急性早幼粒白血病细胞株 HL60、耐三尖杉酯碱的 HL60 细胞株 HT9 由北京师范大学生命科学学院提供,RP-M1640 培养基、胎牛血清购自上海生工生物工程技术服务有限公司,鼠抗人单克隆抗体、HRP 标记山羊抗鼠二抗为北京中山金桥生物技术有限公司产品。ECM830 型电穿孔仪(BTX);荧光定量 RCP 仪(Bio-Rad);流式细胞仪 FC500(Beckman);7700 Real-Time PCR 仪(ABI)。

1.2 方法

1.2.1 pU6/shRNA/*mdr1* 载体的构建 根据 GenBank *P*-糖蛋白编码基因 *mdr1* mRNA 的已知序列(NM_000927),选择 1 个 shRNA 特异性靶位点序列,设计合成编码 shRNA 的 DNA 模板序列:正义链 GATCCGGAGGCCAACATACATGCCTTCAA-GAGAGGCATGTATGTTGGCCTCCTTTTTTGAAA;反义链 AGCTTTTCCAAAAAGGAGGCCAACATACATGCCTCTCTTGAAGGCA TGTATGTTGGCCTCCG,退火形成双链,将其定向克隆到 pSilencer2.1-U6 neo 载体上,shRNA 重组质粒命名为 pU6/shRNA/*mdr1*。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒,测序验证插入序列无突变。大量提取纯化质粒,待转染。

1.2.2 细胞培养及转染 HT9 细胞用含 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 三尖杉酯碱的培养液常规培养,试验前 2 周取出三尖杉酯碱培养细胞。取对数生长期的 HT9 细胞,利用线性化的 pEGFP-N1 质粒优化电转染条件,线性化的 pSilencer 2.1-U6 neo 空质粒、pU6/shRNA/*mdr1* 重组质粒于最佳电转染条件下转染 HT9 细胞,转染后的细胞为 HT9/pU6(空载体对照转染细胞)、HT9/pU6/shRNA(转染重组质粒细胞),转染后用 $600 \mu\text{g/mL}$ G418 筛选建立稳定转染的 HT9 细胞克隆,有限稀

释法挑取单克隆转染细胞。试验另设非耐药对照细胞 HL60, 耐药非转染对照细胞 HT9。

1.2.3 Real-time PCR 检测 *mdr1* mRNA 表达量 采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取各组细胞总 RNA, 用 Real-time PCR 检测以上细胞 *mdr1* 基因的表达式。

表 1 引物序列与扩增片段长度

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
<i>mdr1</i>	F: ATATCAGCAGCCCACATCAT; R: GAAGCACTGGGATGTCGGT	154
β -actin	F: ATCATGTTTGAGACCTCAACA; R: CATCTCTTGCTCGAAGTCCA	318

1.2.4 P-糖蛋白表达量的 Western blot 检测 提取各组细胞总蛋白, 测定样品纯度, 再进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白电转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入鼠抗人 P-糖蛋白单克隆抗体 C219 (1: 40), 室温孵育 1.5 h, PBS 洗膜, HRP 标记的山羊抗鼠二抗 (1: 5 000), 室温孵育 1.5 h, ECL 发光液显影、定影、洗片, 用凝胶图像分析软件分析 X 光片灰度值。

1.2.5 FCM 检测 P-糖蛋白外排泵功能 收集对数生长期各组细胞, 分别与 10 μ g/mL Rho123 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 用预冷的 PBS 洗细胞, 再重悬于预冷的 PBS 中, 用流式细胞仪检测细胞内 Rho123 荧光强度。

1.2.6 MTT 法检测耐药细胞对姜黄素敏感性 收集对数生长期的各组细胞, 按接种量 1 万个/孔接种于 96 孔中, 常规条件下分别与 8 个浓度梯度的姜黄素培养 48 h, 每个浓度 3 个平行, 采用常规四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法 (MTT 法) 于 570 nm 下测定吸光度 *D*, 计算细胞存活率: 细胞存活率 = $\frac{D_{\text{试验组}}}{D_{\text{对照组}}} \times 100\%$, 以药物浓度为横轴, 细胞存活率为纵轴绘制浓度效应曲线, 求出回归方程, 确定半数抑制浓度 (IC_{50}), 并计算相对逆转率: 逆转率 = $\frac{[IC_{50}(A) - IC_{50}(B)]}{[IC_{50}(A) - IC_{50}(C)]} \times 100\%$, $IC_{50}(A)$ 、 $IC_{50}(B)$ 、 $IC_{50}(C)$ 分别代表逆转前耐药细胞、逆转后耐药细胞和亲本敏感细胞的 IC_{50} 。

1.2.7 FCM 检测细胞周期 取对数生长期各组细胞 100 万个, 接种 100 mL 培养瓶内, 分别加入终浓度为 8.0 μ mol/L 姜黄素, 培养 48 h, 800 r/min 离心 10 min 收集细胞, 与 1 mL 预冷的 70% 乙醇充分混匀, 4 $^{\circ}$ C 保存, 至少固定 18 h, 细胞浓度调整为 100 万个/mL, 洗涤, 重悬于 1 mL 含 20 μ g/mL RNase A 和 50 μ g/mL PI 的染液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 用流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.3 数据处理

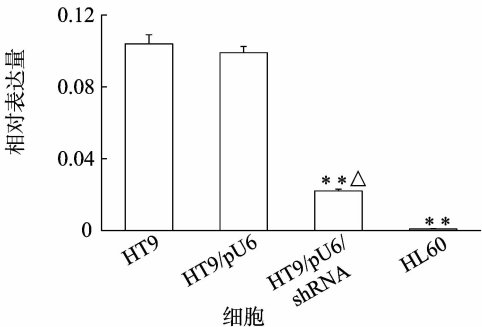
用 SPSS 17.0 进行数据处理, 进行单因素方差分析, 组间差异性分析采用 LSD 法, 数据均以“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 pU6/shRNA/*mdr1* 重组载体对 *mdr1* - mRNA 表达的影响

荧光定量 PCR 结果 (图 1) 显示, HT9/pU6/shRNA 细胞的 mRNA 相对表达量极显著低于 HT9 细胞、HT9/pU6 细胞; 与 HT9 细胞相比, HT9/pU6/shRNA 细胞 *mdr1* 基因的相对表达量降低了 78.84% ($P < 0.01$); HT9/pU6 与 HT9 细胞的 mRNA 相对表达量差异不显著 ($P > 0.05$); HT9/pU6/shRNA 与 HL60 细胞 mRNA 相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。说明

反应体系为 25 μ L: 上、下游引物各 0.25 μ L, SYBR Green I 1 μ L, ddH₂O 18 μ L, cDNA 0.5 μ L。循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸。反应在 ABI 7700 Real Time PCR 仪上进行, 以 β -actin 作为内参对照, 引物序列具体情况见表 1。



**表示与HT9细胞或HT9/pU6 细胞差异极显著; Δ 表示与 HL60 细胞差异显著; 未标的表示差异不显著。 $n=3$ 。
图1 各组细胞中 *mdr1*/ β -actin mRNA 的表达情况

重组质粒 pU6/shRNA/*mdr1* 对 HT9 细胞目的基因 *mdr1* 的表达有一定的干扰作用, 而空载体对目的基因表达无干扰作用。

2.2 pU6/shRNA/*mdr1* 重组载体对 P-糖蛋白表达的影响

用 Western blot 检测各组细胞内 P-糖蛋白水平, 以其与内参 β -actin 的比值表示蛋白相对表达量。结果 (图 2) 显示, HT9/pU6/shRNA 细胞的 P-糖蛋白表达量比 HT9 细胞低 48.27% ($P < 0.05$), HT9/pU6 细胞与 HT9 细胞蛋白相对表达量差异不显著 ($P > 0.05$), HT9/pU6/shRNA 细胞与 HL60 细胞蛋白相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。证实了重组质粒 pU6/shRNA/*mdr1* 对 HT9 细胞 *mdr1* 基因沉默的有效性。

2.3 pU6/shRNA/*mdr1* 重组载体对 P-糖蛋白外排泵功能的影响

经流式细胞术分析 (表 2) 可知, 与 HT9 细胞相比, HT9/pU6/shRNA 细胞的 Rho123 荧光强度极显著增强 ($P < 0.01$), 而 HT9/pU6 细胞内 Rho123 荧光强度变化不显著 ($P > 0.05$); HT9/pU6/shRNA 细胞与 HL60 细胞内荧光强度差异极显著 ($P < 0.01$)。说明转染后的单克隆细胞 HT9/pU6/shRNA 的 P-糖蛋白外排泵功能极显著增强。

2.4 RNAi 对 HT9 细胞的影响

HT9 细胞的 IC_{50} 与 HL60 细胞差异显著, 进一步说明 HT9 细胞具有高度耐药性。姜黄素药物浓度与细胞存活率呈负相关关系, 相同作用条件下, HT9/pU6/shRNA 细胞存活率降低最明显。与 HT9 细胞相比, HT9/pU6/shRNA 细胞对姜黄素的 IC_{50} 极显著降低 ($P < 0.01$), 而 HT9/pU6 细胞对姜黄素的 IC_{50} 降低但差异不显著 ($P > 0.05$); HT9/pU6/shRNA 细胞对姜黄素的 IC_{50} 与 HL60 细胞差异极显著 ($P < 0.01$), 干扰片段对耐药细胞的耐药相对逆转率为 (84.74 \pm 1.86)% (表 3)。

2.5 pU6/shRNA/*mdr1* 重组载体对 HT9 细胞周期的影响

用流式细胞仪检测经姜黄素作用 48 h 的各组细胞周期显示, 与 HT9 细胞相比, HT9/pU6/shRNA 和 HL60 细胞周期

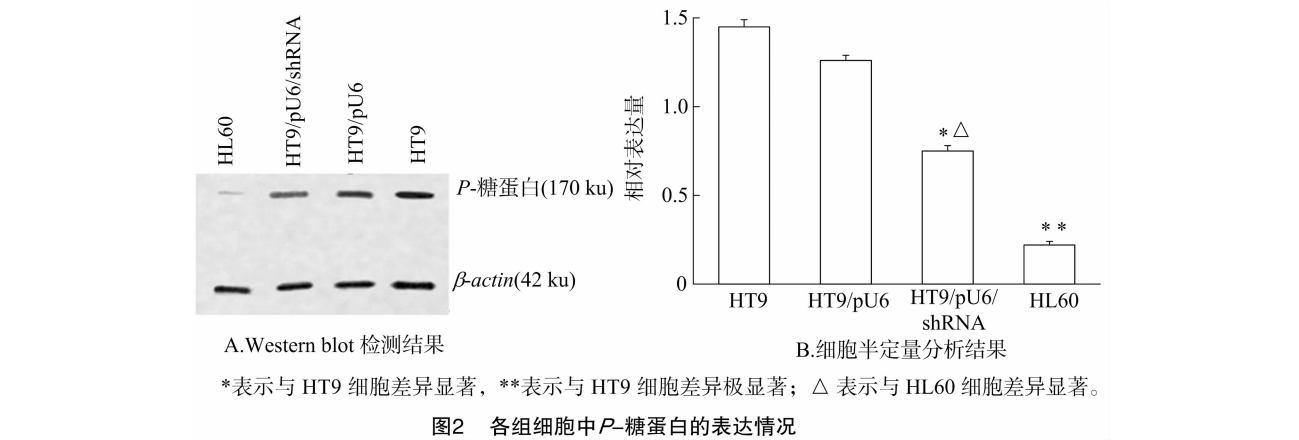


表 2 各组细胞内 Rho123 的相对荧光强度情况	
细胞	Rho123 相对光强度 (%)
HT9	10.80 ± 0.58aA
HT9/pU6	10.44 ± 0.45aA
HT9/pU6/shRNA	73.56 ± 1.37bB
HL60	95.13 ± 1.12cC

注:同列数据后不同小写、大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$) ($n = 3$)。下同。

表 3 各组细胞对姜黄素的敏感性		
细胞	姜黄素 IC ₅₀ (μmol/L)	相对逆转率 (%)
HT9	24.10 ± 0.83aA	—
HT9/pU6	23.56 ± 4.36aA	2.43 ± 0.12
HT9/pU6/shRNA	5.10 ± 0.14bB	84.74 ± 1.86
HL60	1.69 ± 0.03cC	—

发生了明显变化,表现为 S、G2/M 期细胞增多,HT9/pU6 细胞周期未发生明显变化,说明转染细胞 HT9/pU6/shRNA 和 HL60 细胞周期经姜黄素处理后阻滞在 S、G2/M 期(图 3)。

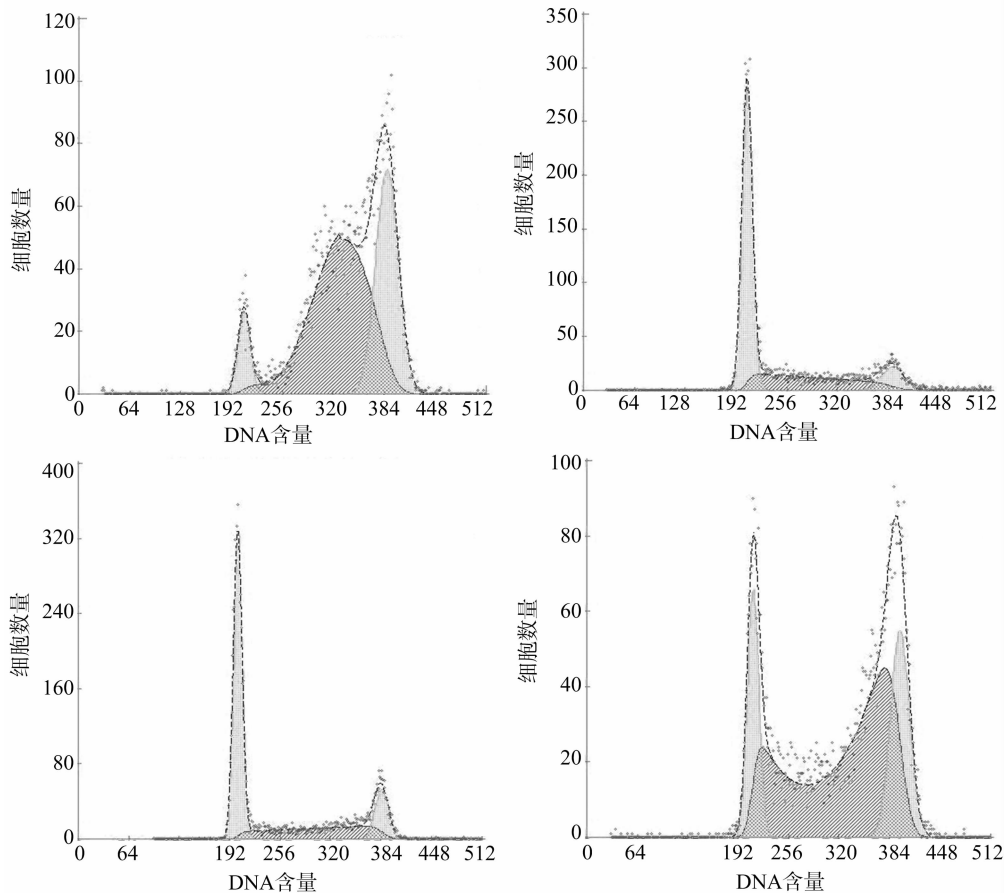
3 结论与讨论

白血病是最常见的造血系统恶性肿瘤之一,目前联合化疗仍然是白血病治疗的重要措施,而白血病细胞多药耐药性的产生则使部分白血病的化疗或预后最终失败。研究表明,在经典的白血病多药耐药表型中,通过对 P-糖蛋白的检测可以判断白血病病人对当前化疗药物是否具有抗性,以选择恰当的治疗方案。耐药逆转剂、免疫治疗、基因治疗等技术已被临床应用于提高肿瘤细胞对药物的敏感性,辅助提高肿瘤治愈率。RNA 干扰技术是近年来发展起来的一项特异性抑制基因表达的基因治疗方法,这一特异、有效的基因沉默技术现已被广泛应用于肿瘤多药耐药等方面的研究^[5-6]。Yague 等将设计的 2 对 pSUPER-shRNA 质粒表达载体转染给白血病耐药细胞 K562/ADR 后,对 *mdr1* 基因表达的抑制率达 95%、97%,细胞对药物的敏感性恢复至与 K562 细胞几乎相同的水平^[7]。Alexandra 等应用 H1 启动子介导的 RNA 干扰载体抑制胃癌 EPC85-257RDB 细胞 *mdr1* 基因表达,细胞耐药逆转率达 74%^[8]。

本试验成功构建了 RNA 干扰 pU6/shRNA/*mdr1* 重组质粒,该重组质粒利用 RNA 聚合酶 III U6 启动子表达 siRNA 分

子,有利于对靶基因表达受到抑制后细胞表型的长期变化进行观察,该重组质粒转染 HT9 细胞后,构建了长期有效的基因沉默细胞模型。经荧光定量 PCR 和 Western 检测可知,与 HT9 细胞相比,单克隆细胞 HT9/pU6/shRNA 的 *mdr1* 基因表达量降低了 78.84% ($P < 0.01$),P-糖蛋白表达量降低了 48.27% ($P < 0.05$),RNAi 对 *mdr1* 基因的表达起到了一定的抑制作用。经流式细胞术检测可知,转染后的 HT9 细胞内荧光强度由 10.8% ± 0.58% 增强到 73.5% ± 1.37%,因 Rho123 是多药抗性细胞 P-糖蛋白的底物,能被蛋白水解释放的能量从细胞内泵出,HT9/pU6/shRNA 细胞内 Rho123 荧光强度的增强反映该细胞药物外排功能减弱。转染后,HT9 细胞经姜黄素处理的 IC₅₀ 由 (24.10 ± 0.83) μmol/L 降至 (5.10 ± 0.14) μmol/L,耐药相对逆转率为 (84.74 ± 1.86)%,经姜黄素作用 48 h 后,细胞周期阻滞在 S、G2/M 期。姜黄素的抗癌机制还未完全清楚,目前已发现它通过延长细胞周期使细胞在 S 期和(或)G2/M 期集聚,达到抗增殖的作用^[9-10],在本试验中已得到证实。

RNAi 技术可通过双链短 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 触发同源性 mRNA 降解^[11],目前有 2 种方式可以获得双链短 RNA。其一,体外合成 siRNA 分子后采用转染、电转化等方法将其导入细胞内发挥作用^[12];其二,利用表达载体或 siRNA 表达框转染细胞,在体内合成所需要的 siRNA 分子。体外合成 siRNA 易被降解,并需专门的 RNA 转染试剂转染细胞,在细胞内的干扰效应持续时间短,利用质粒、病毒类载体介导的 siRNA 表达载体克服了以上缺点^[13],同时载体上的抗性标记有助于快速筛选出转染的阳性单克隆细胞。目前,用于表达 siRNA 的启动子有 RNA 聚合酶 III 类启动子 (pol III) 及 RNA 聚合酶 II 类启动子 (pol II)。这些启动子可以在体内高效转录小的、非编码的、在 5' 端无帽状结构、在 3' 端无多聚腺苷酸化的转录本,启动子总是在离启动子一个固定距离的位置开始转录合成 RNA,遇到 4~5 个连续的 U 即终止,转录产物在第 2 个尿嘧啶处被切下来,非常精确,从而可以限制转录 RNA 的大小;另外,这类启动子本身序列较短,不会形成复杂的空间结构。目前 U6、H1 启动子介导的 RNAi 技术已在多种肿瘤耐药细胞中应用^[14-15]。综上所述,利用质粒介导的 RNAi 可以有效抑制 *mdr1* 基因编码蛋白的表达和功能,提高耐药细胞对姜黄素的敏感性。本研究为白血病耐药逆转治疗提供了理论基础。



左上: HL60; 右上: HT9; 左下: HT9/pU6; 右下: HT9/pU6/shRNA

图3 流式细胞术检测姜黄素作用 48 h 后各组细胞细胞周期变化

参考文献:

- [1] Borst P, Elferink R O. Mammalian ABC transporters in health and disease[J]. Annual Review of Biochemistry, 2002, 71: 537 - 592.
- [2] McKenna S, Padua R A. Multidrug resistance in leukaemia[J]. British Journal of Haematology, 1997, 96(4): 659 - 674.
- [3] Nieth C, Pribsch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi)[J]. FEBS Letters, 2003, 545(2-3): 144 - 150.
- [4] Borel F, van Logtenstein R, Koornneef A, et al. *In vivo* knock-down of multidrug resistance transporters ABCB1 and ABCG2 by AAV-delivered shRNAs and by artificial miRNAs[J]. Journal of RNAi and Gene Silencing, 2011, 7: 434 - 442.
- [5] Kim D W, Kim K O, Shin M J, et al. siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells[J]. Molecular Cancer, 2009, 8(1): 28 - 38.
- [6] Rumpold H, Wolf A M, Gruenewald K, et al. RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines[J]. Experimental Hematology, 2005, 33(7): 767 - 775.
- [7] Yagüe E, Higgins C F, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1[J]. Gene Therapy, 2004, 11(14): 1170 - 1174.
- [8] Stege A, Pribsch 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 Therapy, 2004, 11(11): 699 - 706.
- [9] 厉红元, 车艺, 汤为学. 姜黄素对人实体瘤细胞和白血病细胞作用的比较[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(9): 770 - 773.
- [10] Lu J J, Cai Y J, Ding J. The short-time treatment with curcumin sufficiently decreases cell viability, induces apoptosis and copper enhances these effects in multidrug-resistant K562/A02 cells[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2012, 360(1/2): 253 - 260.
- [11] Pickford A S, Cogoni C. RNA-mediated gene silencing[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60(5): 871 - 882.
- [12] Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded generate new siRNA[J]. Cell, 2001, 107(3): 297 - 307.
- [13] Semizarov D, Frost L, Sarthy A, et al. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(11): 6347 - 6352.
- [14] K W K, Koike H, Sugaya K. RNA interference with small hairpin RNAs transcribed from a human U6 promotor-driven DNA vector[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2003, 93(2): 214 - 217.
- [15] Donzé O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(10): e46.