

MDR1 siRNA 对结肠癌细胞多药耐药性的影响

夏忠胜^{1,2}, 朱兆华¹, 张立勇², 刘仲敏², Bao-Ling Adam²

(1. 中山大学附属第二医院消化内科, 广东 广州 510120; 2. Center for Biotechnology and Genomic Medicine, Medical College of Georgia, Augusta GA 30904, U.S.A)

摘要: 【目的】探讨 MDR1 siRNA 对结肠癌细胞多药耐药性的影响。【方法】设计合成两种针对 MDR1 mRNA 的 siRNA 双链分子 (#4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA), 并转染入 COLO 320DM 和 HT-29 结肠癌细胞, 观察其对结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的影响。并分别与 5-FU、阿霉素和长春新碱等抗肿瘤药联用, 观察结肠癌细胞活力的变化。用阿霉素处理后, 观察转染 MDR1 siRNA 结肠癌细胞的细胞内阿霉素累积浓度的变化。RT-PCR 检测细胞 MDR1 mRNA 的表达, 免疫印迹法检测细胞 P-gp 的表达, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞内阿霉素累积浓度。【结果】#4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA 均可抑制 COLO 320DM 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达, 其最低有效浓度分别为 5 nmol/L 和 25 nmol/L。同时 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的抑制伴随着抗肿瘤药(5-FU、阿霉素和长春新碱)对 COLO 320DM 结肠癌细胞毒性的增强和细胞内阿霉素累积浓度的增加。而在对照 HT-29 结肠癌细胞却观察不到此效应。【结论】MDR1 siRNAs 能特异逆转结肠癌细胞的多药耐药性, 为 MDR1/P-gp 依赖的多药耐药性结肠癌的治疗提供了一条新的途径。

关键词: 小干扰 RNA; MDR1; P-糖蛋白; 结肠癌; 多药耐药性

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)03-0268-06

Effect of MDR1 siRNA on Multidrug Resistance of Colon Cancer Cells

XIA Zhong-sheng^{1,2}, ZHU Zhao-hua¹, ZHANG Li-yong², LIU Zhong-min², ADAM Bao-ling²

(1. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Center for Biotechnology and Genomic Medicine, Medical College of Georgia, Augusta GA 30904, U.S.A)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of MDR1 siRNA on multidrug resistance (MDR) of colon cancer cells. 【Methods】Two siRNAs targeting to MDR1 mRNA (#4123 MDR1 siRNA and #4029 MDR1 siRNA) were designed and chemically synthesized. MDR1 siRNAs were transfected into COLO 320DM and HT-29 colon cancer cells respectively. The expression of MDR1 mRNA and P-gp were observed. Cell viability of colon cancer cells were measured after treatment of MDR1 siRNAs combined with 5-FU, adriamycin, and vincristine, respectively. Intracellular Adriamycin accumulation of colon cancer cells were assessed after being treated with MDR1 siRNAs and Adriamycin. MDR1 mRNA expression was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). P-gp expression was detected by Western blot. Cell viability of cell was measured by MTT assay. Intracellular Adriamycin accumulation assay was performed by flow cytometry (FCM). 【Results】Both #4123 and #4029 MDR1 siRNAs were capable of inhibiting MDR1 mRNA and P-gp of COLO 320DM colon cancer cells. The minimum concentration of #4123 and #4029 MDR1 siRNA for COLO 320DM cell line were 5 nmol/L and 25 nmol/L, respectively. In the meantime, inhibition of expression of MDR1 mRNA and P-gp was correlated with the increased cytotoxicity of the antitumor drugs (5-fluorouracil, adriamycin, and vincristine) and the increased intracellular adriamycin accumulation. Such effect could not be found in HT-29 control cell line. 【Conclusion】MDR1 siRNAs specifically reversed the MDR of colon cancer cells, which demonstrates MDR1 siRNA may present a new approach for the treatment of MDR1/P-gp-dependent MDR in colon cancer.

Key words: small interfering RNA; MDR1; P-glycoprotein; colon cancer; multidrug resistance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):268-273]

收稿日期: 2007-01-08

基金项目: 美国佐治亚肿瘤联合会 (Georgia Cancer Coalition) 基金 (GCC00026)

作者简介: 夏忠胜 (1971-), 男, 湖北嘉鱼人, 中山大学和美国 Medical College of Georgia 联合培养在职博士研究生, 主治医师, E-mail: xiashzh@hotmail.com

结肠癌细胞多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 的产生是导致结肠癌患者化疗失败的主要原因之一。肿瘤细胞经典的 MDR 与一 170 ku 的膜糖蛋白, P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的过表达有关^[1]。P-gp 能将化疗药转运出细胞而降低细胞内化疗药的累积浓度。以往的研究发现钙拮抗剂如维拉帕米、反义寡核苷酸和锤头核糖酶等能部分逆转 MDR1/P-gp 依赖的多药耐药性。但钙拮抗剂存在导致心衰及低血压等心血管副作用, 而反义寡核苷酸和锤头核糖酶的临床应用价值还未得到完全证实。因此, 仍有待寻找新的方法来逆转肿瘤细胞的多药耐药性。近年发现的一种抑制特异基因表达的新方法是采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)^[2]。siRNA 是 21-23 nt 长度的双链 RNA 分子, 能以序列特异的方式降解真核细胞内的 mRNA^[3], 从而抑制蛋白的产生。本研究采用两种人工合成的 MDR1 siRNAs 转染结肠癌细胞, 观察 MDR1 siRNAs 能否抑制结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达, 并进一步观察转染 MDR1 siRNAs 及联合应用抗肿瘤药后, 结肠癌细胞在细胞增殖及细胞内药物累积浓度等方面的变化。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人结肠癌细胞系 COLO320DM 和 HT-29 购自美国 ATCC 公司。10%胎牛血清、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、阿霉素 (Adriamycin)、长春新碱 (Vincristine)、噻唑蓝 (Methylthiazolotetrazolium, MTT)、二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) 均购自美国 Sigma 公司。RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司。Opti-MEM[®] I 无血清培养液、脂质体 Lipofectamine[™] 2000、RNA 提取试剂 TRIzol、cDNA 合成试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。荧光染料 SYBR green I 及 FCD 购自美国 Roche 公司。PCR 扩增引物均由美国 IDT 公司合成。鼠抗人 P-gp 单克隆抗体 (C219) 购自美国 Signet 公司。鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司。羊抗鼠 HRP-IgG、BCA[™] 蛋白浓度检测试剂盒购自美国 Pierce 公司。ECL 化学发光试剂盒购自美国 Amersham Biosciences 公司。

1.2 siRNA 的合成及转染

根据德国 Genix Biosciences GmbH 公司推荐的 siRNA 设计原则, 设计靶向 MDR1 基因(基因序

列号 NM_000927) 的 siRNA 序列。两种 siRNA (#4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA)、阳性对照 (β -actin) siRNA 和阴性对照 siRNA 均由美国 Ambion 公司合成。#4123 MDR1 siRNA 正义序列为 5'-GGAUUUUAGGACCAUAAAUtt-3', 反义序列为 5'-AUUUUAUGGUCCUAAUAUCctg-3'; #4029 MDR1 siRNA 正义序列为 5'-GGAAUUUUAGAAG AUCUGAtt-3', 反义序列为 5'-UCAGAUUUU CUAAUUUUCctg-3'。根据厂家建议的方法采用 Lipofectamine[™] 2000 进行 siRNA 的转染。为探讨 MDR1 siRNAs 对 COLO 320DM 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的抑制作用, COLO 320DM 结肠癌细胞接种于 24 孔板, 两种 MDR1 siRNAs 分别以不同的浓度转染 COLO 320DM 结肠癌细胞, 未经任何处理的细胞设为对照组, 只用 Lipofectamine[™] 2000 处理的细胞为脂质体对照组, 用 50 nmol/L β -actin siRNA 处理的细胞为阳性对照组, 用与人类基因无同源性序列的阴性对照 siRNA 处理的细胞为阴性对照组。转染后 72 h, 收集细胞。采用实时 RT-PCR 检测 MDR1 mRNA 的表达; 采用 Western blot 检测 P-gp 的表达。

1.3 实时 RT-PCR

细胞接种生长于 6 孔板。采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。采用 Invitrogen 公司的 cDNA 合成试剂盒反转录合成 cDNA。合成的 cDNA 采用美国 Bio-Rad 公司的 iCycle 实时 PCR 仪扩增, 于 25 μ L 反应体系中加入 1 μ L cDNA 模板, 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 2.5 U Taq polymerase, 10 pmol MDR1 正向引物 (5'-AAAAAGATCAACTCGTAG GAGTG-3'), 10 pmol MDR1 反向引物 (5'-GC ACAAATACACCAACAA-3'), 0.63 μ L SYBR green I 和 0.25 μ L FCD。采用 β -actin 作为内参照, β -actin 扩增的正向引物为 5'-AACACCCCA GCCATGTAC-3', 反向引物为 5'-ATGTCACG CACGATTTCC-3'。实时 PCR 反应条件为: 先 95 $^{\circ}$ C 热变性 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C (MDR1) 或 56 $^{\circ}$ C (β -actin) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 扩增 40 个循环。根据荧光强度曲线, 选取荧光强度呈指数增长期的循环次数 (MDR1 26 个循环, β -actin 23 个循环) 再进行常规 PCR 扩增。MDR1 和 β -actin 扩增片段分别为 161 bp 和 254 bp。

1.4 免疫印迹法 (Western blot) 检测 P-gp

生长于 6 孔板的细胞去培养液, 用冷 PBS 洗 1

次, 加裂解液 (30 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1% SDS) 500 μ L/孔, 放置于冰上裂解 30 min 后, 转移至 EP 管, 12 000 \times g、4 离心 15 min, 取上清。采用 BCA™ 蛋白浓度检测试剂盒测定细胞总蛋白含量。取 5 \times g 细胞蛋白进行 7.5% SDS-PAGE 凝胶电泳。100 V 2.5 h 电转膜至 PVDF 膜, 10%脱脂牛奶室温封闭 3 h, 加一抗(C219, 1 100 稀释, 室温孵育过夜; β -actin, 1 4000 稀释, 室温孵育 3 h), 用 TBS-T 洗膜液洗膜 6 次, 每次 5 min。再加二抗 (羊抗鼠 HRP-IgG, 1 6000 稀释) 室温孵育 1 h, 用 TBS-T 洗膜液洗膜 6 次, 每次 5 min。最后加 ECL 显影。

1.5 MTT 法检测细胞活力

为探讨 MDR1 siRNAs 能否逆转 COLO 320 DM 结肠癌细胞的多药耐药性, #4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA 分别转染入 COLO 320 DM 和 HT-29 结肠癌细胞, 并分别用 5-FU、Adriamycin 及 Vincristine 处理 3 天, 最后用 MTT 法检测细胞活力。细胞接种于 96 孔板, 每孔细胞数 1×10^4 , 生长 24 h 后转染 MDR1 siRNAs, 4 h 后加抗肿瘤药。MDR1 siRNAs 采用最低有效浓度 (5 nmd/L #4123 MDR1 siRNA 和 25 nmd/L #4029 MDR1 siRNA)。在 COLO 320DM 结肠癌细胞, 抗肿瘤药 5-FU、Adriamycin 和 Vincristine 使用的终浓度分别为 4 μ mol/L、0.32 μ mol/L 和 0.0128 μ mol/L; 在 HT-29 结肠癌细胞, 抗肿瘤药 5-FU、Adriamycin 和 Vincristine 使用的终浓度分别为 8 μ mol/L、0.16 μ mol/L 和 0.0016 μ mol/L。细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 温箱内孵育 72 h。每孔加 30 μ L 5 mg/mL MTT, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 弃培养液, 加 150 μ L DMSO, 室温震荡 5 min, 在 Synergy HT 酶联仪上以 570 nm 波长读取 OD 值。未经任何处理的对照组细胞活力设为 1, 通过与对照组比较计算其他各组细胞活力。

1.6 细胞内 Adriamycin 累积浓度测定

根据文献报导的标准方法^[4], 转染 MDR1 siRNAs 后, 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 温箱内孵育 48 h, 加入 10 μ mol/L Adriamycin 继续孵育 2 h 后, 收集细胞, 用冷 PBS 洗两次, 置于冰上终止反应。采用 FACSCalibur™ 流式细胞仪测定细胞的荧光强度, 荧光强度的大小反映细胞内 Adriamycin 的累积浓度。测定的激发光波长为 488 nm, 接受光波长为 575 nm。

1.7 统计学分析

计量资料用均数 \pm 标准差表示, 多组之间计量资料的比较采用析因设计的方差分析, P 值 < 0.01 为差异有统计学意义。采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学分析。

2 结果

2.1 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达

采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 COLO 320 DM 和 HT-29 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达。如图 1 A 所示, RT-PCR 分析表明 COLO 320 DM 结肠癌细胞有 MDR1 mRNA 的表达, 而 HT-29 结肠癌细胞无 MDR1 mRNA 的表达。Western blot 检测结果与 RT-PCR 检测结果一致, 如图 1 B 所示, COLO 320DM 结肠癌细胞表达 P-gp, 而 HT-29 结肠癌细胞未检测到 P-gp 的表达。

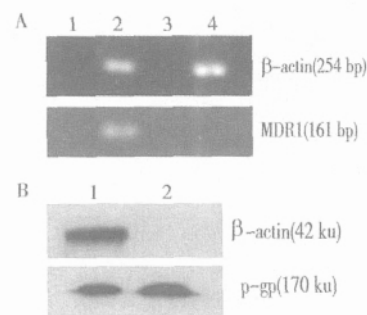


图 1 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 及 P-gp 表达的检测

Fig.1 Detection of MDR1 mRNA and P-gp in colon cancer cells

A: RT-PCR; 1: no cDNA template added; 2: COLO 320DM cell line; 3: no cDNA template added; 4: HT-29 cell line; B: Western blot; 1: COLO 320 DM cell line; 2: HT-29 cell line.

2.2 MDR1 siRNAs 对 COLO 320DM 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的抑制

见图 2, 50 nmd/L、25 nmd/L、15 nmd/L 及 5 nmd/L 的 #4123 MDR1 siRNA 能完全抑制 COLO 320DM 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 的表达, 50 nmd/L 和 25 nmd/L 的 #4029 MDR1 siRNA 亦能完全抑制 COLO 320DM 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 的表达。Western blot 检测结果与实时 RT-PCR 检测结果一致 (图 2 B)。根据实时 RT-PCR 和 Western blot 检测结果可以发现, 在 COLO 320DM 结肠癌细胞, #4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA 的最低有效浓度分别为 5 nmd/L 和 25 nmd/L。

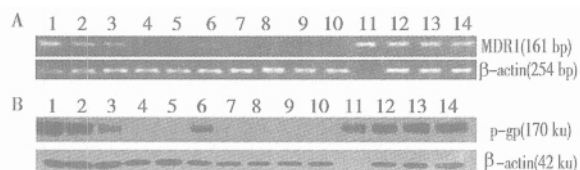


图 2 不同浓度 MDR1 siRNAs 对结肠癌细胞 MDR1 mRNA 及 P-gp 表达的影响

Fig.2 Influence of different concentrations of MDR1 siRNAs on expression of MDR1 mRNA and P-gp in colon cancer cells

A: real time PCR; B: Western blot; 1: 1 nmol/L #4029 MDR1 siRNA; 2: 5 nmol/L #4029 MDR1 siRNA; 3: 15 nmol/L #4029 MDR1 siRNA; 4: 25 nmol/L #4029 MDR1 siRNA; 5: 50 nmol/L #4029 MDR1 siRNA; 6: 1 nmol/L #4123 MDR1 siRNA; 7: 5 nmol/L #4123 MDR1 siRNA; 8: 15 nmol/L #4123 MDR1 siRNA; 9: 25 nmol/L #4123 MDR1 siRNA; 10: 50 nmol/L #4123 MDR1 siRNA; 11: - actin siRNA positive control; 12: negative control; 13: liposome control; 14: control

2.3 MDR1 siRNAs 增强 COLO 320DM 结肠癌细胞对化疗药的敏感性

采用析因设计的方差分析表明 (表 1), #4123 MDR1 siRNA (A) 和 #4029 MDR1 siRNA (B) 本身均不能抑制 COLO 320DM 和 HT-29 结肠癌细胞的生长, 但 A 与 5-FU 联合处理 COLO 320DM 结肠癌细胞后, 细胞活力较单用 5-FU 降低更多, 差异有显著性 ($F=167.8, P<0.01$); 同样, B 与 5-FU 联合处理 COLO 320DM 结肠癌细胞后, 细胞活力较单用 5-FU 亦降低更多, 差异有显著性 ($F=106.4, P<0.01$)。当 A 与 Adriamycin 联用时, COLO 320DM 结肠癌细胞活力较单用 Adriamycin 降低更明显, 差异有显著性 ($F=262.3, P<0.01$); 同样, B 与 Adriamycin 联用时, COLO 320DM 结肠癌细胞活力较单用 Adriamycin 降低亦更明显, 差异有显著性 ($F=134.5, P<0.01$)。在用 A 或 B 与 Vincristine 联合处理 COLO 320DM 结肠癌细胞, 亦可观察到类似现象, A 与 Vincristine 联用时, 细胞活力较单用 Vincristine 更低, 差异有显著性 ($F=65.7, P<0.01$); B 与 Vincristine 联用时, 细胞活力较单用 Vincristine 亦更低, 差异有显著性 ($F=40.3, P<0.01$)。但在对照 HT-29 结肠癌细胞, 两种 MDR1 siRNAs 与 5-Fu, Adriamycin 或 Vincristine 联用对细胞生长的抑制作用与各自单用抗肿瘤药相比无显著差异。

2.4 MDR1 siRNAs 处理后 COLO 320DM 结肠癌细胞内 Adriamycin 累积浓度的变化

表 1 转染 MDR1 siRNAs 及分别与抗肿瘤药联用后结肠癌细胞的细胞活力

Table 1 Cell viability of colon cancer cells after MDR1 siRNAs transfection combined with antitumor drugs respectively

	COLO 320DM	HT-29(%)
Control	100.0 ± 1.2	100.0 ± 4.3
Liposome only	98.4 ± 2.2	99.8 ± 4.0
A	97.8 ± 3.1	97.6 ± 4.1
B	98.8 ± 2.8	96.8 ± 9.5
5-FU	84.3 ± 2.7 ¹⁾	80.1 ± 4.5 ¹⁾
Liposome +5-FU	83.3 ± 3.9 ¹⁾	79.5 ± 4.8 ¹⁾
A+5-FU	62.4 ± 4.1 ^{1), 2)}	79.1 ± 4.9 ¹⁾
B+5-FU	65.7 ± 5.6 ^{1), 2)}	78.8 ± 4.5 ¹⁾
Adriamycin	83.2 ± 2.7 ¹⁾	80.1 ± 5.0 ¹⁾
Liposome+Adriamycin	81.9 ± 3.7 ¹⁾	80.4 ± 4.7 ¹⁾
A+Adriamycin	63.4 ± 1.7 ^{1), 3)}	78.8 ± 3.2 ¹⁾
B+Adriamycin	61.6 ± 5.6 ^{1), 3)}	78.9 ± 4.8 ¹⁾
Vincristine	84.3 ± 6.5 ¹⁾	82.7 ± 7.1 ¹⁾
Liposome+Vincristine	82.1 ± 4.5 ¹⁾	83.9 ± 7.4 ¹⁾
A+Vincristine	59.8 ± 7.1 ^{1), 4)}	82.1 ± 5.4 ¹⁾
B+Vincristine	62.6 ± 9.9 ^{1), 4)}	82.7 ± 6.3 ¹⁾

1) compared with control, $P<0.01$; 2) compared with 5-FU, $P<0.01$; 3) compared with Adriamycin, $P<0.01$; 4) compared with vincristine, $P<0.01$

为探讨 MDR1 siRNAs 能否增加细胞内抗肿瘤药的累积浓度, 进行细胞内 Adriamycin 累积浓度分析 (表 2)。在 COLO 320DM 结肠癌细胞, 单用 Adriamycin 处理后荧光强度为 194, 但与 #4123 MDR1 siRNA (A) 联用后, Adriamycin 荧光强度增加至 405, 差异有显著性 ($F=195.7, P<0.01$); 与 #4029 MDR1 siRNA (B) 联用后, Adriamycin 荧光强度增加至 375, 差异有显著性 ($F=367.8, P<0.01$)。但在对照 HT-29 结肠癌细胞, Adriamycin 与两种 MDR1 siRNAs 联用后, Adriamycin 荧光强度较单用 Adriamycin 无显著增加。

表 2 转染 MDR1 siRNAs 后结肠癌细胞 Adriamycin 荧光强度
Table 2 Fluorescence intensity of Adriamycin of colon cancer cells after MDR1 siRNA transfection

	COLO 320DM cell line	HT-29 cell line
Control	4 ± 0	8 ± 1
Adriamycin control	194 ± 24	248 ± 18
Adriamycin liposome control	202 ± 13	262 ± 5
Adriamycin+A	405 ± 41 ¹⁾	272 ± 14
Adriamycin+B	375 ± 22 ¹⁾	253 ± 9

1) compared with Adriamycin control, $P<0.01$

3 讨 论

3.1 MDR1 siRNAs 能特异抑制结肠癌细胞的 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达

COLO 320DM 是人结肠癌多药耐药细胞系, 对包括 Adriamycin、Vincristine 及 5-FU 等在内的多种抗肿瘤药具有抗药性。COLO 320DM 结肠癌细胞表达 P-gp, 因此 COLO 320DM 结肠癌细胞是 MDR1/P-gp 依赖的结肠癌多药耐药细胞^[5]。而 HT-29 结肠癌细胞是非 MDR1/P-gp 依赖的结肠癌多药耐药细胞, 因为 HT-29 结肠癌细胞不表达 P-gp, 其多药耐药性的产生与 MRP (multidrug resistance protein, MRP) 的表达有关^[6]。本研究采用 COLO 320DM 和 HT-29 结肠癌细胞来探讨 MDR1 siRNAs 对 MDR1/P-gp 依赖的结肠癌多药耐药细胞 MDR 的干扰效应。在另外两个有关结肠癌和 MDR 的 RNA 干扰实验的报道中^[7,8], 结肠癌细胞的 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达均可经 RNA 干扰而降低, 但在此两个报导中均未设既具有 MDR 特性又不表达 P-gp 的对照细胞, 因此无法判断针对 MDR1 mRNA 设计的 MDR1 siRNAs 是否对既有 MDR 特性又不表达 P-gp 的结肠癌细胞的 MDR 特性具有调节作用。本研究发现, MDR1 siRNAs 能抑制 COLO 320DM 结肠癌细胞的 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达, 而且 MDR1 siRNAs 还能增强抗肿瘤药 5-FU、Adriamycin 及 Vincristine 对 COLO 320DM 结肠癌细胞的细胞毒作用。但在对照 HT-29 结肠癌细胞, MDR1 siRNAs 不能增强这些抗肿瘤药对 HT-29 结肠癌细胞的细胞毒作用, 表明作用于 MDR1 mRNA 靶点的 MDR1 siRNAs 的干扰效应是特异的。

3.2 MDR1 siRNAs 在 COLO 320DM 结肠癌细胞的最小抑制浓度

本研究显示 #4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA 均能抑制 COLO 320DM 结肠癌细胞的 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达, 但对 β -actin 的表达无影响。而 β -actin siRNA 能抑制 β -actin mRNA 和 β -actin 的表达, 但对 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达无影响, 这些都进一步说明 MDR1 siRNAs 对 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的抑制是特异的。本研究发现 #4123 MDR1 siRNA 完全抑制 COLO 320DM 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的

最小浓度为 5 nmd/L, 而 #4029 MDR1 siRNA 的最小浓度为 25 nmd/L (图 2)。该浓度均低于其他作者报导的 MDR1 siRNAs 的最适浓度 (200 nmd/L)^[9,10], 这可能是由于不同研究中采用的 MDR1 siRNAs 序列不同所造成的, 也可能是由于采用的细胞系不同所造成。但我们知道, 太高浓度 (通常 >100 nmd/L) 的 siRNA 会导致非特异的基因沉默现象^[11]。因此, 本研究中 MDR1 siRNAs 的抑制效应更可信。

3.3 MDR1 siRNAs 能增强抗肿瘤药对结肠癌细胞的细胞毒作用

将 5 nmd/L #4123 MDR1 siRNA 和 25 nmd/L #4029 MDR1 siRNA 分别转染入 COLO 320DM 和 HT-29 结肠癌细胞, 4 h 后分别加 5-FU、Adriamycin 或 Vincristine 处理细胞。MTT 法检测细胞活力显示 #4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA 本身对 COLO 320DM 和 HT-29 结肠癌细胞的增殖均无作用, 但与 5-FU、Adriamycin 或 Vincristine 等抗肿瘤药联用后与单用抗肿瘤药相比, 能杀死更多 COLO 320DM 结肠癌细胞。但在对照细胞, #4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA 与 5-FU、Adriamycin 或 Vincristine 等抗肿瘤药联用与单用抗肿瘤药相比, 却不能杀死更多 HT-29 结肠癌细胞, 表明两种 MDR1 siRNAs 均能增强化疗药对 MDR1/P-gp 依赖的结肠癌多药耐药细胞的细胞毒作用, 但对非 MDR1/P-gp 依赖的结肠癌多药耐药细胞无此作用。因此, MDR1 siRNAs 介导的细胞毒增强作用是特异的。

3.4 MDR1 siRNAs 能增加 COLO 320DM 结肠癌细胞内 Adriamycin 累积浓度

细胞内 Adriamycin 累积浓度分析显示 #4123 MDR1 siRNA 和 #4029 MDR1 siRNA 均能增加 COLO 320DM 结肠癌细胞内 Adriamycin 累积浓度, 但不能增加 HT-29 结肠癌细胞内 Adriamycin 累积浓度。此结果与 MTT 法检测细胞活力的结果一致, 表明 MDR1 siRNAs 能抑制 MDR1/P-gp 依赖的结肠癌多药耐药细胞 P-gp 的功能, 但不能抑制非 MDR1/P-gp 依赖的结肠癌多药耐药细胞药物转运泵的功能。

3.5 本研究的不足及将来的研究方向

本研究的结果是基于 MDR1 siRNAs 瞬时转染所得到的, 但瞬时转染方法的不足之处在于基因表达的暂时抑制, 不能长期抑制, 因此, RNA 干扰效应通常仅持续几天^[12]。而且, 本研究 MDR1 siRNAs

对 COLO 320DM 结肠癌细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的抑制作用是在体外实验观察得到的。因此,将来需要构建 MDR1 siRNA 表达载体来观察长期稳定的 RNA 干扰效应,而且有必要在体内观察此效应。此外,临床应用中还需考虑另外一个问题:因为 MDR1 基因产物 P-gp 不仅存在于恶性肿瘤细胞,同时也存在于一些正常组织如外周血和骨髓中的造血干细胞。因此,在临床上,MDR1 siRNA 表达载体应仅作用于 MDR1/P-gp 表达的多药耐药肿瘤细胞,而对表达 MDR1/P-gp 的正常细胞无作用。最近报道一种复制子缺陷的 E1A- 突变型腺病毒载体仅选择性地经典的在经典的多药耐药肿瘤细胞中复制^[13],这一病毒载体可能为多药耐药肿瘤细胞特异性的基因治疗提供了一种新的方法。

参考文献:

- [1] GERMANN U A, PASTAN I, GOTTESMAN M M. P-glycoproteins: mediators of multidrug resistance [J]. *Semin Cell Biol*, 1993, 4(1): 63- 76.
- [2] CAPLEN N J, PARRISH S, IMANI F, et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(17): 9742- 9747.
- [3] LIPARDI C, WEI Q, PATERSON B M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs [J]. *Cell*, 2001, 107(3): 297- 307.
- [4] VAN RENSBURG C E, JOONE G K, O SULLIVAN J F. Clofazimine and B4121 sensitize an intrinsically resistant human colon cancer cell line to P-glycoprotein substrates[J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(1): 193- 195.
- [5] LI J, XU L Z, HE K L, et al. Reversal effects of norgestrol acetate on multidrug resistance in adriamycin-resistant MCF7 breast cancer cell line [J]. *Breast Cancer Res*, 2001, 3(4): 253- 263.
- [6] KOK J W, VELDMAN R J, KLAPPE K, et al. Differential expression of sphingolipids in MRP1 overexpressing HT29 cells [J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(2): 172- 178.
- [7] 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.
- [8] PICHLER A, ZELCER N, PRIOR J L, et al. In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(12): 4487- 4494.
- [9] PENG Z, XIAO Z, WANG Y, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(11): 707- 712.
- [10] WU H, HAIT W N, YANG J M. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1515- 1519.
- [11] SEMIZAROV D, FROST L, SARTHAY A, et al. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(11): 6347- 6352.
- [12] NIETH C, PRIEBSCHE 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.
- [13] HOLM P S, LAGE H, BERGMANN S, et al. Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(1): 322- 328.

(编辑 孙慧兰)