文章编号:1000-5404(2008)01-0035-04

论著

RNA 干扰逆转肝细胞癌多药耐药

潘光栋[1],严律南[2],王新平[2],杨家印[2],夏庆杰[2],闫乃红[2],陈清英[2],张发强[2] ([1]广西医科大学第五附属医院肝胆外科,广西 柳州 545001;[2]四川大学华西医院普通外科,成都 610041)

摘 要:**目的** 筛选高效 dsRNA/mdr1,以备研究 RNA 干扰逆转肝细胞癌多药耐药之用。**方法** 首先根据 siRNA 设计原则,以多药耐药基因(mdr1)为靶基因,设计并选择 4 ~ 5 条 siRNA/mdr1,经 BLAST 后体外转录法合成 dsRNA/mdr1,用 Oligofectamine 试剂分别转染 HepG2/mdr1,然后从 mRNA、蛋白(P-gp)表达水平和细胞功能变化评价 HepG2/mdr1 耐药性被逆转的程度,比较各个 dsRNA/mdr1 的逆转效率,筛选出有效的 siRNA/mdr1。**结果** 成功合成 5 条 dsRNA/mdr1(其中 1 条为阴性对照),dsRNA/mdr1-4 mRNA 表达(18.73 ± 1.33)%、蛋白表达变化(79.1 ± 1.6)% ~ (16.8 ± 0.4)% 与其他各组细胞比较,有显著性差异;细胞内柔红霉素(DNR)累积量也较其他组明显增加(平均荧光强度 79.58,阳性率 84.25%,$P < 0.05$)。**结论** 体外转录法结合脂质体转染适用于筛选高效 siRNA,肯定了 siRNA 干扰序列能够有效阻抑 mdr1 基因编码蛋白 p170 的功能。

关键词:肝细胞癌;多药耐药;RNA 干扰
中图法分类号:R394-33;R73-36;R735.7 **文献标识码**:A

Reversal of multidrug resistance of hepatocellular carcinoma by siRNA/mdr1

PAN Guang-dong[1], YAN Lu-nan[2], WANG Xin-ping[2], YANG Jia-yin[2], XIA Qing-jie[2], YAN Nai-hong[2], CHEN Qing-ying[2], ZHANG Fa-qiang[2] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, the Fifth Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Liuzhou 545001, Guangxi; [2]Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To screen effective dsRNA/mdr1 for studying the reversal of multidrug resistance of hepatocellular carcinoma (HCC) by RNA interference (RNAi). **Methods** dsRNA/mdr1 targeting multidrug resistance gene (mdr1) was designed and synthesized by *in vitro* transcription. HepG2/mdr1 in 6 groups was transfected with the complex of different dsRNA/mdr1 (dsRNA/mdr1-1, dsRNA/mdr1-2, dsRNA/mdr1-3, dsRNA/mdr1-4, dsRNA/mdr1-5) using Oligofectamine. Then the cells were collected to measure the expression of mRNA/mdr1, P-glycoprotein and the accumulation of DNR. **Results** Five dsRNA/mdr1 were successfully synthesized including one negative. The expression of mRNA/mdr1 [(18.73 ± 1.33)%] and P-glycoprotein [from (79.1 ± 1.6)% before transfection down to (16.8 ± 0.4)%] in dsRNA/mdr1-4 was significantly lower than that of other groups ($P < 0.05$). Accumulation of DNR in dsRNA/mdr1-4 was higher than that in other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** *In vitro* transcription combined with liposome is fit to screen the effective dsRNA/mdr1. siRNA/mdr1 could suppress the expression of P-glycoprotein coded by mdr1 gene.

Key words: hepatocellular carcinoma; multidrug resistance; RNA interference

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指特定目的基因被与其互补的小分子干扰 RNA 片段(small interfering RNA, siRNA)特异抑制引起 mRNA 转录后沉默,称为转录后基因沉默(post-transcription gene silencing, PTGS)。多药耐药基因 1(multidrug resistance gene1, mdr1)编码的 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是多药耐药肿瘤细胞的跨膜转运蛋白,能将细胞内化疗药物外排,其过度表达是肿瘤细胞耐药的主要原因,抑制 P-gp 的过度表达可以逆转肿瘤的多药耐药现象。因而选择特异性和效率强的 siRNA/mdr1 成为首要条件。根据文献介绍的 siRNA 设计原则,我们合成、筛选了特异性强、抑制效率高的 siRNA/mdr1,以供构建长期表达载体之用。

基金项目:国家自然科学基金(30170925);广西科学基金(0728102)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170925) and the Scitentific Foundation of Guangxi Province (0728102)
作者简介:潘光栋,男,广西壮族自治区北海市人,博士,副主任医师,主要从事肝胆疾病的临床、基础方面的研究,发表论文 22 篇。电话:(0772)2857107, E-mail:pgdhx@126.com
通信作者:严律南,E-mail:yanlunan688@163.com
收稿日期:2007-01-16 修回日期:2007-10-08

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HepG2 和 HepG2-mdr1 用于实验组和对照组,分别由本实验室提供和本课题组陈永兵[1]博士构建。

1.1.2 主要试剂和仪器 Trizol 试剂盒购自 TaKaRa 公司;Oligofectamine 转染试剂购自 Invitrogen 公司;Silencer siRNA construction 试剂盒购自 Ambion 公司;DNA 模板由上海生工公司合成;RPMI1640 培养液购自 Gibco/BRL 公司;阿霉素(ADM)、柔红霉素(DNR)为深圳万乐药业有限公司生产;Super Script™逆转录试剂盒(Invitrogen 公司);DU640 全自动核酸 & 蛋白质分析仪(Beckman,USA);Gel Doc 全自动凝胶分析仪(Bio-Rad,意大利);Gene Amp 2400 PCR system (perlinemer,USA);DYY-4 型稳压稳流电泳仪(北京 61 仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 搜索 mdr1 全长基因和 21nt 序列,用 Blast 比较排除其同源性序列 从 PubMed GenBank 中找到 mdr1 基因(序列号 AF016535),从其转录本(mRNA)的起始密码子 AUG 开始,寻找 AA 序列,并记下其 3′端的 19 个碱基序列,作为潜在的 siRNA 靶位点。使用 NCBI 的 Blast 排除那些和其他编码序列/EST 同源的序列。共设计 4 条 siRNA/mdr1,同时设计第 5 条序列为阴性对照。

根据选中的目标序列设计其反义链模板 DNA,一并送上海生工公司合成。

1.2.2 dsRNA/mdr1 的合成 按说明书以 Silencer siRNA construction 试剂盒合成 5 个 dsRNA/mdr1,经纯化后 -20 ℃保存。

1.2.3 高效 dsRNA/mdr1 的筛选 将 HepG2-mdr1 细胞复苏、培养,以 200 ~400 mg/L G418 和 0.25 ~0.50 mg/L 阿霉素筛选稳定细胞株并消化传代。同法复苏 HepG2 细胞,RPMI1640 完全培养基培养。以倒置相差显微镜观察并记录上述两种细胞的正常形态。

接种 HepG2/mdr1 细胞至 96 孔培养板,待细胞覆盖率达 80% 时,将细胞分 1、2、3、4、5、6 组,每组 6 孔,其中第 1 组为非转染组,另设 6 孔 HepG2 细胞作为对照。用 Oligofectamine 转染试剂,按试剂盒操作说明,优化转染条件,细胞融合达 90% 以上时分别将 dsRNA-mdr1-1、dsRNA-mdr1-2、dsRNA-mdr1-3、dsRNA-mdr1-4、dsRNA-mdr1-5(阴性对照)以 100 nmol/L 的终浓度加入相应组别 HepG2/mdr1 细胞,培养 72 h 后收获细胞进行检测。

1.2.4 RT-PCR 检测 HepG2/mdr1 mRNA 的表达水平

1.2.4.1 培养细胞总 RNA 提取 用 Trizol 试剂提取转染后 72 h 的各组细胞的总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 28S、18S、5S 3 条带,无 DNA 污染条带,无明显降解条带,表明所提取的总 RNA 纯度较高。

1.2.4.2 引物设计 mdr1 正义链:5′-TTACACGTGGTTGGAAGC-3′,反义链 5′-CATAGATCAGCAGGAAAG-3′,扩增产物 218 bp;GAPDH 正义链:5′-TGGGTGTGAACCACGAGAA-3′,反义链 5′-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3′,扩增产物 143 bp。

1.2.4.3 通过逆转录反应合成 cDNA,RT-PCR 扩增 mdr1 mRNA 逆转录反应在 1 个 50 μl 的反应体系中进行,体系组成如下 先将总 RNA 在 70 ℃变性 10 min,冰上冷却 3 min,混合反应体系,置 42 ℃水浴 1 h,完成逆转录,置 95 ℃水浴中 5 min,将酶灭活后立即置冰浴中。

1.2.4.4 电泳与图像分析 取 10 μl PCR 产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查和照相,以 GAPDH 作为内参照,用核酸、蛋白质分析仪进行半定量检测,Mdr1 条带在 218 bp 处,GAPDH 条带在 143 bp 处。

1.2.5 流式细胞术(FCM)定量测定 P-gp 表达 取培养72 h 的 HepG2、HepG2/mdr1 细胞,消化液消化后,用培养液终止,滴管吹散细胞。分别将细胞悬液移入 10 ml 塑料离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,去上清。再用生理盐水洗 1 次,以 1 000 r/min离心 5 min,去上清。重悬细胞,分别加 P-gp 单抗 1 h 后,加 GFP 标记的兔抗鼠 IgG_2,室温避光孵育 1 h。每管加 1 ml PBS 洗涤,以 1 000 r/min 离心 5 min,去上清。每管加 0.5 ml PBS,重悬细胞并吹散。同法收集各组转染前的细胞,一并送流式细胞仪检测 P-gp。

1.2.6 流式细胞术检测细胞内 DNR 积累量 将经 siRNA 转染 72 h 后的细胞(HepG2/mdr1-dsRNA)按 1×10^6/ml 细胞浓度与 1 μg/ml 的 DNR 37 ℃ 共同孵育 1 h 后,冰浴终止 DNR 的作用,PBS 洗 2 次,收集细胞,同样处理分设 5 管,另设未经转染的 HepG2/mdr1 为对照组,同样收集细胞,用流式细胞仪测定细胞内荧光强度。用相对荧光强度表示高低和 DNR 在细胞内积累量。

相对荧光强度 = (实验组荧光强度 ÷ 对照组荧光强度) × 100%

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件,配对资料行 t 检验

2 结果

2.1 根据设计原则选中的序列

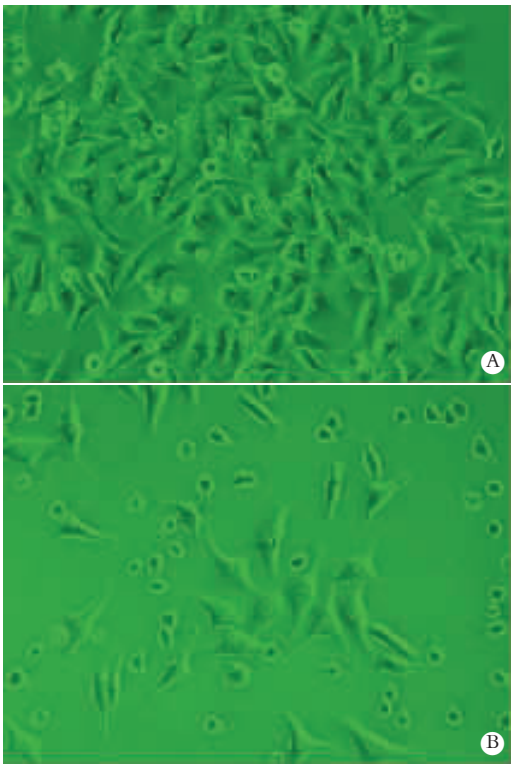
si-mdr1-正义链-1:5′-AATGATACAGGGTTCTTCATGCCTGTCTC-3′,si-mdr1-反义链-1:5′-AACATGAAGAACCCTGTATCACCTGTCTC-3′;si-mdr1-正义链-2:5′-AATCTGGAGGAAGACATGACCCCT-3′,si-mdr1-反义链-2:5′-AAGGTCATGTCTTCCTCCAGACCTGTCTC-3′;si-mdr1-正义链-3:5′-AATGCGACAGGAGATAGGCTGCCTGTCTC-3′,si-mdr1-反义链-3:5′-AACAGCCTATCTCCTGTCGCACCTGTCTC-3′;si-mdr1-正义链-4:5′-AAGGATATTAGGACCATAAATCCTGTCTC-3′,si-mdr1-反义链-4:5′-AAATTTATGGTCCTAATATCCCCTGTCTC-3′;si-mdr1-正义链-5:5′-AAACCGACGAGTGGTAGGATGCCTGTCTC -3′,si-mdr1-反义链-5:5′-AACATCCTACCACTCGTCGGTCCTGTCTC-3′。

2.2 细胞转染前后形态学改变

细胞转染前后形态学上无明显差别,见图 1。

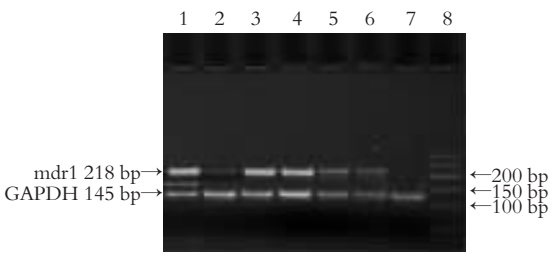
2.3 RT-PCR 检测 mdr1 mRNA 的表达

各组细胞均检测到不同程度的 mdr1 mRNA 的表达,而以第 5 组细胞 HepG2/mdr1-si-4 和敏感株细胞 HepG2 的 mdr1 mRNA 表达最低,其间无显著差异($P > 0.05$),与其他各组细胞的表达水平比较,有显著性差异($P < 0.05$),见图 2。



A：转染前 HepG2/mdr1；B：转染后 HepG2/mdr1

图 1　转染前后 HepG2/mdr1 细胞形态　（倒置显微镜 ×100）



1：HepG2/mdr-si-5；2：HepG2/mdr-si-4；3：HepG2/mdr-si-3；4：HepG2/mdr-si-2；5：HepG2/mdr-si-1；6：HepG2/mdr；7：HepG2；8 标准

图 2　RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.4　流式细胞术检测 P-gp 表达

各组 P-gp 的表达受抑制的阳性率下降不一致，以 siRNA-mdr1-4 组明显，由处理前的（79.1 ± 1.6）% 降至（16.8 ± 0.4）%（$P < 0.01$）。阴性对照组处理前后 P-gp 表达阳性率分别为（78.2 ± 1.3）% 和（75.6 ± 1.2）%，无意义链组处理前后 P-gp 表达阳性率分别为（77.4 ± 1.2）% 和（74.2 ± 1.9）%，差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 1。

表 1　siRNA 转染前后 P-gp 表达水平变化［($\bar{x} \pm s$) %］

组别	转染前	转染后	P
HepG2/mdr1	75.3 ± 1.3	75.4. ± 1.2	1.25
HepG2/mdr1-si-1	75.3 ± 1.4	70.1 ± 7.0	0.96
HepG2/mdr1-si-2	78.8 ± 1.6	71.5 ± 1.2	0.87
HepG2/mdr1-si-3	74.2 ± 1.6	68.3 ± 1.6	0.58
HepG2/mdr1-si-4	79.1 ± 1.6	16.8 ± 0.4	0.00
HepG2/mdr1-si-5	77.4 ± 1.2	74.2 ± 1.9	0.69

2.5　细胞内 DNR 积累量的变化

用 siRNA 处理 72 h 后，各组 HepG2/mdr1 细胞内 DNR 积累量均有明显增高（表 2），但与敏感株细胞相比，荧光强度和阳性率仍较低。

表 2　siRNAs 处理后细胞内 DNR 积累量（$n = 5$）

组别	平均荧光强度	阳性率
HepG2	87.34	96.52
HepG2/mdr1	38.61	31.20
HepG2/mdr1-si-1	37.91	26.84
HepG2/mdr1-si-2	43.63	35.20
HepG2/mdr1-si-3	45.90	38.79
HepG2/mdr1-si-4	79.58[b]	84.25[b]
HepG2/mdr1-si-5	54.12[a]	47.65[a]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 HepG2/mdr1 组比较

2.6　比较实验结果

选出高效 siRNA 链为第 4 条，序列如下：si-mdr1-正义链-4：5′-GGAUAUUAGGACCAUAAAUTTCCTGTCTC-3′，si-mdr1-反义链-4：5′-AUUUAUGGUCCUAAUAUCCTGCCTGTCTC-3′。基因 mdr1 靶序列：5′-GGATATTAGGACCATAAAT-3′。

3　讨论

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是指特定的目的基因被与其互补的双链小 RNA 特异抑制引起其 mRNA 转录后沉默，它具有高效性、强特异性。它将与目的基因同源的含 21 ~ 23 个核苷酸的 siRNA 转染至细胞内，与细胞内的内切酶形成诱导沉默复合体（RNA induced silencing complex，RISC），RISC 以 siRNA 为模板特异性识别其同源基因 mRNA，并对其进行递进式剪切，形成强有效的瀑布效应，诱导序列特异的 mRNA 降解，从而抑制基因表达[2,3]。经过研究，对 RNAi 的机制有了一定的了解，但其具体的作用机制尚未完全清楚。为了更有效地识别目的基因的 mRNA，设计、选择 siRNA 很重要，同源性越高，效率越好。因此，必须严格按照 siRNA 序列设计原则设计[4]。在所选的 siRNA 序列中，由于可能存在与其他编码序列或 EST 同源的序列（人或鼠），需在 GenBank 用 Blast Research 软件进行同源序列搜索，排除那些和其他编码序列或 EST 同源的序列。在实践中，还有研究者总结出优化 siRNA 设计的若干规则，比如低 G/C 含量（45% ~ 55%），缺乏反向重复序列，正义链 3′端稳定性低，特殊位置具有优势碱基 U、A、G 等（第 3、10、13、19 位碱基）的 siRNA，其转染效率会较高[5]。

选中的序列是否高效，还要经过实验证实。据报道[5]，一般情况下，按照 siRNA 设计原则选出的 siRNA 中，每 2 ~ 4 个序列中可能有 1 个序列是高效或有效的，但具体是哪一个，必须经过 siRNA 转染抑制实验筛选。可以从 mRNA 水平，也可以从 P-gp 蛋白水平、细胞功能水平检测。

siRNA 的合成有多种方法，各有优缺点[6]。化学合成法制备 siRNA 是目前最常用的方法，可以合成高质量的 siRNA，但费用昂贵。其他方法例如还有长片段 dsRNA 经 RNA 酶降解，降解过程中 siRNA 易被其他因素灭活；siRNA 表达载体或者病毒载体在细胞中表达 siRNA，可用于体外实验，但制作过程较复杂；也可用 PCR 制备 siRNA。体外转录法利用双链复合体（depluxes）体外直接转录出特异双链 siRNA，此方法费用低、毒性小、效率高，主要用于筛选 siRNA，尤其当需要制备多种 siRNA 或化学合成的价格太高时可选用。本实验利用此法合成了 4 条 dsRNA，经过实验筛选出满足进一步研究使用的高效链，达到了实验目的。

细胞经转染 dsRNA 后特异目的基因的表达和功能出现变化[7,8]。本实验以合成的 dsRNA 分别转染 HepG2、HepG2/mdr1 细胞后，从蛋白水平和细胞功能水平检测其转染效率。我们发现，第 4 个序列的 siRNA 能显著抑制 P-gp 的表达；HepG2/mdr1 细胞内 DNR 积累量不但与阴性对照组相比有显著差异，而且比转染 si-mdr-1、2、3 组明显提高。按同样原则设计的 4 条 dsRNA 中，si-mdr1-4 对 mdr1 基因的抑制效率明显高于另外 3 条，显示了 RNA 干扰的特异、高效特性，其具体作用机制尚需进一步研究。本实验所用的转染试剂 Oligofectamine 为阳离子脂质体，能直接将 siRNA 转染进入 $HepG_2$/mdr1 内，不需要其他特殊介质，方法简单、稳定，转染效率也较高，很适合于筛选有效 siRNA。本实验结果肯定了 siRNA 干扰序列能够有效阻抑 mdr1 基因编码蛋白 p170 的功能，并筛选出高效 siRNA-mdr1，为进一步研究提供了可用的 dsRNA/mdr1。

参考文献：

[1] 陈永兵，余少鸿，严律南，等. 多药耐药真核表达载体的构建及其在人肝癌细胞 HepG2 中表达[J]. 中国普外基础与临床杂志，2005，12(3)：254－257.

[2] Dernburg A F，Karpen G H. A chromosome RNAissance[J]. Cell，2002，111(2)：159－162.

[3] Borkhardt A. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment？[J]. Cancer Cell，2002，2(3)：167－168.

[4] Elbashir S M，Harborth J，Weber K，*et al*. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods，2002，26(2)：199－213.

[5] Reynolds A，Leake D，Boese Q，*et al*. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol，2004，22(3)：326－330.

[6] Harborth J，Flbashir S M，Vandenburgh K，*et al*. Sequence，chemical，and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev，2003，13(2)：83－105.

[7] Morris K V，Chan S W，Jacobsen S E，*et al*. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells[J]. Science，2004，305(5688)：1289－1292.

[8] 王 芳，周紫垣，刘胜学，等. 利用 siRNA 干扰 MGMT 基因表达的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(11)：1138－1140.

（编辑 王小寒）

（上接 30 页）

升主动脉根部打孔，然后将静脉桥与升主动脉行端侧吻合，彻底止血。术后患者血压升至 90/70 mmHg，心率约 110 次/min，4 h 后心电图 ST 段恢复正常，术后次日血压稳定为 99～100/57～76 mmHg。术后多次复查心电图、心肌酶谱和心脏超声均正常，3 周后患者痊愈出院。术后 3 月后复查心电图及超声提示正常。

讨论

心脏开放性外伤的损伤位置一般为右心室，这与其解剖位置有关，本例患者损伤位置处于室间沟处，造成横断冠状动脉前降支，以前病例报道较少。回顾本例患者的救治过程，有以下几点值得考虑：①手术切口：急诊刀刺伤手术，一般情况采取从患侧第 4 或第 5 肋间进胸，两次手术或择期手术均采用正中切口。本例患者，从原创口第 6 肋进胸，扩大前胸部外侧切口，较好的暴露手术视野，同时尽可能的减少对患者的创伤，对患者的呼吸循环功能的影响降低到最小。②心脏伤口靠近冠状动脉时，如未损伤冠状血管，一般处理应用血管下潜行缝合，以保证冠状动脉血管的血流通畅，可以避免心脏愈合后产生创伤性心肌桥。

心室裂口肌肉丰富不易钳夹，一般用手指堵住止血后，再行缝合处理，建议心脏创口较小时可用室缺线直接“8”字缝合或褥式缝合，较大的创口可使用垫片针褥式缝合，使伤口愈合合好，不会产生假性室壁瘤。冠状动脉损伤立即行冠状动脉搭桥术，减少心肌缺血的危险。本例患者损伤冠状动脉，需要马上行冠脉搭桥术，但当不具有搭桥手术的条件时，给予冠状动脉缝扎术，为下次手术提供较好的手术机会。但缝扎冠状动脉，会造成急性心肌梗死，及冠状动脉血管急性血栓的形成，使患者丧失搭桥的机会。就本例来看，心脏缝扎患者因转送及搭桥及时，未造成严重后果。急诊冠脉外伤时，非体外循环下行冠脉搭桥手术常作为首要选择[1]，就其优点是取消了建立体外循环的步骤，节省时间。但术野出血较多的问题难以解决，本例患者心肌缺血时间较长，且经过冠状动脉缝扎术后，具有动脉血栓形成的危险，同时心肌缺血时间较长，选择较为稳妥的体外循环下行冠状动脉搭桥手术优势较明显[2]。

总之，急诊冠状动脉搭桥对外伤性冠状动脉损伤造成的急性心肌缺血具有很好的治疗效果，手术方式的采用往往对患者生命的救治及术后的愈合影响很大。

关键词：心脏外伤 冠状动脉搭桥
中图法分类号：R654.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] 付向宁，江 科，孙志强，等. 心脏外伤急诊非体外循环冠状动脉搭桥一例[J]. 中华创伤杂志，2003，19(10)：606.

[2] 田 辉，邵国丰，张志梁，等. 18 例外伤性心脏破裂的诊治[J]. 中华胸心血管外科杂志，2006，22(1)：72.

（编辑 王 红）