文章编号:1000-5404(2008)12-1179-04

论著

RNA干扰MRP2表达逆转结肠癌细胞对长春新碱的耐药性

杨 毅[1],姜习新[2],王继见[1],周洪伟[1] (重庆医科大学:[1]附属第二医院普通外科,[2]临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市重点实验室,重庆 400010)

摘 要:目的 构建MRP2基因的真核表达载体pGenSil-1-MRP2-siRNA,并观察其转染人结肠癌耐长春新碱细胞株HCT-8/V前后MRP2基因和ABCC2蛋白表达变化以及对化疗药物敏感性变化。**方法** 设计MRP2特异性siRNA的序列,克隆至pGenSil-1质粒中,测序鉴定后,用脂质体将重组质粒转染至HCT-8/V细胞中,用定量RT-PCR和Western blot检测MRP2的表达,MTT实验测定pGenSil-1-MRP2-siRNA和长春新碱对HCT-8/V细胞增殖抑制作用。**结果** 在结肠癌耐药细胞HCT-8/V中,RNAi明显抑制了MRP2 mRNA及蛋白的表达,在相同浓度化疗药物的作用下,RNA干扰组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,对药物敏感性显著增高。**结论** 成功构建了MRP2的siRNA真核表达载体,并且对结肠癌耐药细胞MRP2的表达有明显抑制作用,取得良好的逆转耐药效果。

关键词: 多药耐药;MRP2;RNA干扰;质粒
中图法分类号: R73-361;R730.23;R735.35 **文献标识码:** A

RNAi silenced MRP2 reverses drug resistance of colorectal cancer cell line to vinblastine

YANG Yi[1], JIANG Xi-xin[2], WANG Ji-jian[1], ZHOU Hong-wei[1] ([1]Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, [2]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To construct the RNAi eukaryotic vector of inhibitory member of MRP family (MRP2) gene and after the vector transfection into HCT-8/V cell line to observe its interfering effect on MRP2 expression and the changed sensibility to vinblastine. **Methods** The specific siRNA sequence was designed according to the MRP2 sequence. The sequence was cloned into pGenSil-1 and then sequenced. The recombinant plasmid was transfected into HCT-8/V cells by liposome. Then MRP2 expression in the transfected cells was analyzed by FQ-PCR and Western blotting. MTT test was used to measure the inhibitory effects of pGenSil-1-MRP2-siRNA on the proliferation of HCT-8/V cells treated with vinblastine. **Results** The overexpression of MRP2 was suppressed efficiently by the introduction of small interfering RNA that caused sequence-specific gene silence. The apoptotic rate of HCT-8/V cells transfected with pGenSil-1-MRP2-siRNA increased significantly when the cells were exposed to vinblastine as compared with that of nontransfected cells ($P<0.01$), indicating the drug resistance of the transfected cells decreased. **Conclusion** The RNAi eukaryotic vector pGenSil-1-MRP2-siRNA is constructed successfully. The RNAi we constructed inhibits MRP2 expression effectively and reverses the drug resistance of HCT-8/V cells.

Key words: multidrug resistance; MRP2; RNAi; plasmid

化疗一直是以手术为主的大肠癌综合治疗的重要手段,而多药耐药(multidrug resistance,MDR)是临床化疗效果不佳的主要原因。多药耐药的发生机制之一是多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance associated protein2, MRP2)基因以及蛋白(ABCC2蛋白)的高表达。RNA干扰(RNA interference, RNAi)现象自1998年Fire等[1]首次报道以来,已成为一种特异性抑制靶基因表达的有效工具。本研究通过构建MRP2基因的小干扰RNA(small interfere RNA, siRNA)真核表达载体,观测其对MRP2基因的沉默作用,探讨应用RNA干扰逆转肿瘤耐药的可能性,探索促进肿瘤治疗的新策略,为进一步实验提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

带有U6启动子的质粒pGenSil-1购自武汉晶赛生物有限

作者简介:杨 毅,男,湖南省衡山市人,硕士研究生,主要从事胃肠肿瘤基因治疗方面的研究。电话:13883140678
通信作者:王继见,E-mail: Wangjj1963@163.com
收稿日期:2007-10-16;修回日期:2007-12-21

公司;人结肠癌耐长春新碱细胞株(HCT-8/V 细胞株)购自南京凯基公司;T_4DNA 连接酶,*Hind* Ⅲ、*Bam*H Ⅰ、SYBR EXSCRIPT™RT-PCR Kit 和 PrimeScript™RT reagent Kit 均购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒及质粒小抽提取试剂盒等购自购自华舜公司;MRP2 一抗(兔抗人 MRP2 多克隆抗体)购自北京中山公司;RPMI1640 购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;干扰 DNA 序列及引物由上海生工公司合成;长春新碱(VCR)购自北京赛科药业有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的设计及靶位选择 根据 GenBank 中 MRP2 序列,利用 siRNA 设计工具"siRNA sequenceselector"设计针对 MRP2 (NM_000392)特异性 siRNA 序列,序列为 GAGTAAGACCATTCAGGTC,经 BLAST 分析未发现同源序列。siRNA 插入序列上游限制位点为 *Bam*H Ⅰ,下游限制位点为 *Hind* Ⅲ,Loop 序列为 TTCAAGAGA。siRNA 插入序列正义链为 5′-GATCCGAGTAAGACCATTCAGGTCTTCAAGAGAGACCTGAATGGTCTTACTCTTTTTTA-3′,反义链为 5′-AGCTTAAAAAAGAGTAAGACCATTCAGGTCTCTCTT-GAAGACCTGAATGGTCTTACTCG-3′,目的寡核苷酸片段由上海生工公司合成。

1.2.2 pGenSil-1-MRP2-siRNA 载体的构建与鉴定 ①寡核苷酸片段退火形成双链:2 条寡核苷酸各 2 μg(4 μl),退火 Buffer 46 μl。95 ℃ 5 min,72 ℃ 10 min,缓慢降至室温,4 ℃保存。②pGenSil-1 质粒酶切过夜,胶回收线性化空载体。③用 DNA 连接酶将目的片段与线性化空载体连接。④将连接好的质粒转化大肠杆菌 DH5α,用含卡那霉素的平板筛选,挑取阳性菌落提取质粒酶切鉴定并测序,并将重组质粒命名为 pGenSil-1-MRP2-siRNA。

1.2.3 细胞培养 人结肠癌耐长春新碱细胞株 HCT-8/V 培养于加入了 2 000 ng/ml 长春新碱的 10% 胎牛血清的 1640 培养液,在 5% CO_2、37 ℃条件下,2 ~ 3 d 后,用 0.025% 胰酶消化,传代 1 次。

1.2.4 转染 HCT-8/V 细胞经胰酶消化后,铺于 6 孔板,使其细胞数达到 10^5/ml,转染时细胞应 75% 长满。240 μl 无血清 DMEM 中加入 4 μg 质粒,静置 5 min 后,加入含有 16 μl 脂质体的 250 μl 的无血清 DMEM,轻轻颠倒混匀后静置 30 min。将 500 μl 的 DNA 脂质体混合物加入用无血清 DMEM 清洗 3 遍的 6 孔板中,加无血清 DMEM 至 2 ml。以转染 pGenSil-1 HK 为空白质粒组,转染 pGenSil-1-MRP2-siRNA 质粒为干扰组,未转染质粒为对照组。5% CO_2、37 ℃条件下,4 h 后换成无长春新碱的 10% 胎牛血清的 1640 培养液。筛选 24 h 后观察荧光,G418 (800 μg/ml)筛选 2 d。

1.2.5 提取 mRNA,合成 cDNA 6 孔板上转染后 72 h 的细胞加裂解液后提取 mRNA,将提取的 mRNA 凝胶电泳鉴定后,进行 RT 反应。反应条件如下:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。将 cDNA -20 ℃保存。

1.2.6 制作定量 PCR 的标准品 MRP2 基因设计引物为 P1:5′-CTGGTTGGGAACCTGACTGT-3′,P2:5′-CAACAGCCACAATGTTGGTC-3′,以及内参 NADPH 引物 P1:5′-CAATTCCCTCCAAAATCAAGTG-3′,P2:5′-GCAGAGGGGGCAGAGATGA-3′。将合成的 cDNA 进行 RT-PCR,两者 PCR 反应条件如下:94 ℃ 5 min,94 ℃ 20 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,35 个循环。MRP2 的产物长度为 172 bp,内参产物的长度为 139 bp。RT-PCR 的产物和 pMD18-T Vector 相连,载体和产物的物质的量比为 1∶10,DNA 连接酶 1 μl 16 ℃连接过夜。将连接产物 10 μl 转化至 DH5α 后,在含氨苄青霉素(50 μg/μl)的 LB 固体平板筛选,37 ℃培养过夜。挑选阳性克隆菌落 PCR 测序鉴定。提取质粒,浓度为 0.22 μg/μl。

1.2.7 SYBR EXSCRIPT™ Real-time 荧光定量 PCR 根据所测定的质粒浓度,算出起始 Ct 值。$A = C/B \times 6.02 \times 10^{14}$。C:0.206 μg/μl,B:相对分子质量。根据公式计算质粒起始 $Ct = 1 \times 10^{11}$。以 10^{10}、10^9、10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3稀释内参质粒和样本质粒,用 EASY Dilution 稀释。以 10^5、10^4、10^3、10^2、10^1浓度制作标准曲线。反应条件:95 ℃ 10 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 31 s,40 个循环。最后做熔解曲线,确定反应物的单一性,并将不同浓度的定量的模板的对数和相应 Ct 值作图,绘制标准曲线。根据标准曲线计算样品 cDNA 浓度。标本均重复检测 3 次,并用 SDS 2.2 图像定量分析软件进行数据处理。

1.2.8 Western blot 检测 MRP2 蛋白表达 将转染干扰质粒的 HCT-8/V 细胞,48 h 后提取蛋白,步骤按蛋白提取说明书操作。PVDF 膜分别与兔抗人的 MRP2 (1∶200)、β-actin(1∶500)多克隆抗体(终浓度 2 g/ml),将膜移至羊抗兔 IgG-HRP 二抗中,37 ℃孵育 2 h,用 ECL 化学发光系统检测。将显色的 PVDF 膜通过凝胶成像系统进行灰度扫描。

1.2.9 MTT 实验 取对数生长期细胞,脂质体转染 pGenSil-1-MRP2-siRNA 质粒 48 h 后收集细胞,调整细胞数为 5×10^5/ml,接种于 96 孔板,每孔 200 μl (含细胞数 1×10^5/ml),待细胞贴壁后,加入长春新碱。实验设 2 组:转染 pGenSil-1-MRP2-siRNA 质粒为干扰组,未转染质粒为对照组。药物长春新碱浓度梯度为(μg/ml):0.02、0.05、0.10、0.15、0.20、0.30。每个药物浓度设 3 个复孔,共培养 2 d 后,每孔加入 MTT(5 mg/ml) 20 μl,置 CO_2 培养箱孵育 4 h,弃之。每孔加入 DMSO 200 μl,振荡 20 s,测 490 nm 波长吸光度值[D(490)]。计算细胞抑制率。

细胞抑制率(%) = [1 - 干扰组 D(490)/对照组 D(490)] × 100%

1.3 统计学处理

所有检测实验重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

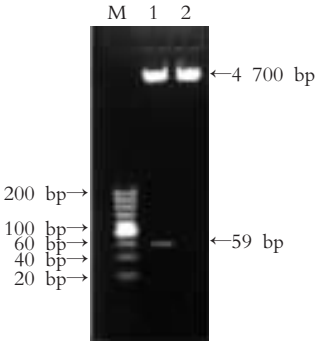
2.1 重组质粒 pGenSil-1-MRP2-siRNA 的构建与酶切鉴定

重组子(pGenSil-1-MRP2-siRNA)经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切后呈现 2 条带,分别为 59 bp 的干扰片段和约 4.7 kb 的线性载体片段。空载体为单一的一条带(图 1)。将重组质粒测序,结果表明 siRNA 表达模板成功构建于 pGenSil-1 载体上,序列完全正确(324 ~ 382 bp),与目的序列相同。

2.2 荧光定量 PCR 结果

荧光定量 RT-PCR 的标准曲线图中标准品 cDNA 的起始浓度的对数值与 Ct 值成一直线,重复性好,斜率接近 -2.241 2,相关系数(r^2) = 0.994 6。熔解曲线分析显示,MRP2 基因 PCR

产物的熔解曲线峰值分别在 81.9 ℃,熔解温度均一,峰的形状也较锐利,这充分说明 MRP2 的 PCR 产物均比较特异,无杂带。MRP2 扩增产物的强度与内参照 NADPH 的比值在干扰组和对照组分别为(0.144 ± 0.042)和(0.458 ± 0.055),两者存在显著性差异(P < 0.01);而空白质粒组和干扰组分别为(0.426 ± 0.057)和(0.144 ± 0.042),两者也存在统计学差异(P < 0.01)。空白质粒组和对照组两者间无统计学差别(P > 0.05)。

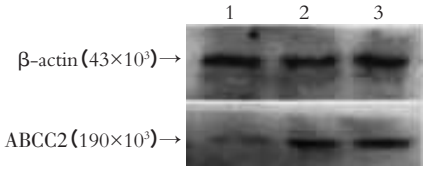


M:DNA 标准(20 bp DNA 梯度);1: *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切重组质粒pGenSil-1-MRP2-siRNA;2: 空载质粒 pGenSil-1

图 1　重组质粒双酶切鉴定

2.3　Western blot 结果

转染后 HCT-8/V 细胞 ABCC2 蛋白和 β-actin 蛋白的表达水平 HCT-8/V 细胞转染 pGenSil-1-MRP2-siRNA 后与对照组相比,ABCC2 蛋白表达明显下降,表达量(与内对照 β-actin 的灰度值比值)由(0.551 ± 0.024)下降为(0.133 ± 0.056)(P < 0.01),β-actin 表达没有变化;而转染空白质粒组与对照组相比,ABCC2 蛋白表达无明显变化(P > 0.05)。见图 2。



1: 干扰组;2: 空白质粒组;3: 对照组

图 2　ABCC2 蛋白和 β-actin 的 Western blot 结果

2.4　MTT 结果

如表 1 所示,在一定范围内的相同浓度化疗药物的作用下,转染 pGenSil-1-MRP2-siRNA 的干扰组细胞抑制率明显高于对照组(P < 0.01),表明细胞耐药性明显下降。

表 1　不同浓度 VCR 对 HCT-8/V(对照组)和转染 pGenSil-1-MRP2-siRNA 的 HCT-8/V(干扰组)细胞增殖的影响

VCR 浓度	对照组		干扰组	
	D(490)	细胞抑制率(%)	D(490)	细胞抑制率(%)
0 μg/ml	1.07 ± 0.02		1.04 ± 0.06	
0.2 μg/ml	0.90 ± 0.05	15.8	0.89 ± 0.04	14.0
0.5 μg/ml	0.78 ± 0.02	27.1	0.63 ± 0.06[a]	39.4
1.0 μg/ml	0.76 ± 0.06	29.0	0.39 ± 0.04[b]	62.5
1.5 μg/ml	0.69 ± 0.05	35.5	0.33 ± 0.05[b]	68.3
2.0 μg/ml	0.64 ± 0.05	40.2	0.18 ± 0.03[b]	82.7
3.0 μg/ml	0.17 ± 0.03	84.1	0.15 ± 0.03	85.6

a: P < 0.05, b: P < 0.01, 与对照组比较

3　讨论

大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,目前治疗总体疗效不佳。引起这一问题产生的一个重要原因是肿瘤对化疗药物产生多药耐药性,其中 MRP2 就被认为是引起多药耐药的因素之一。简要的说,MRP2 的肿瘤耐药机制为:MRP2 主要在谷胱甘肽(GSH)存在的条件下,通过对器官内的有机阴离子的排泄使药物与谷胱甘肽同时跨膜转移到细胞外而导致耐药;另外,MRP2 改变细胞内药物的分布,或在细胞内隔离药物,使药物无法与靶位点结合,导致间接耐药。研究显示在 HepG2 细胞内大量导入 MRP2 基因可以显著增强肿瘤细胞对一些抗癌药物排除的敏感性,从而出现对化疗药物如长春新碱、喜树碱、阿霉素等耐药表现[2,3]。近年发现 MRP2 是对紫杉醇、开普拓、三苯氧胺等药物具有抗药性的一个重要因素[4,5],因此 MRP2 表达的调节与肿瘤细胞对化疗药物的敏感性之间有着密切的关系。在针对 MRP2 基因的治疗上也取得了一些成果。陈琳等[6]运用重组腺病毒介导 MRP 反义 RNA 能有效逆转人肝癌细胞多药耐药表型,携带 MRP 反义 RNA 的重组腺病毒转染后的人肝癌耐药细胞对 ADM(阿霉素)、DNR(柔红霉素)的耐药倍数值都显著降低。Folmer 等[7]将 MRP2 反义 RNA 的重组腺病毒注入肝癌模型裸小鼠血液中,显著恢复了癌细胞对长春新碱的敏感性。而 Materna 等[8]运用 RNA 干扰技术沉默 MRP2 基因,有效的逆转了卵巢癌 A2780RCIS 细胞对顺柏,紫衫醇的耐药。

RNA 干扰技术作为一种新的基因治疗手段,已成功应用于各个领域的研究。本实验针对 MRP2 基因,成功构建了 MRP2 的 siRNA 真核表达载体 pGenSil-1-MRP2-siRNA,转染到结肠癌耐药细胞株 HCT-8/V,通过 SYBR Green 实时定量 PCR 和 Western blot 检测 MRP2 基因及其蛋白的表达,结果显示干扰组 MRP2 的表达与对照组及空白质粒组相比明显降低(P < 0.01),而对照组和空白质粒组比较无明显差异(P > 0.05),说明 RNA 干扰取得了一定的效果,发挥了抑制作用。在实验中,我们发现在 0.5、1.0 μg/ml 长春新碱浓度下,干扰组细胞凋亡率比对照组显著提高,细胞耐药性显著降低,而此浓度长春新碱药物毒性很小,由此进一步说明了我们针对 MRP2 基因设计的干扰质粒不但能有效地逆转耐药细胞对化疗药物的耐受,而且对化疗药物对细胞的毒副作用有较好的改善。

本研究利用针对 MRP2 基因 DNA 表达载体研究 RNA 干扰,有效的逆转了癌细胞的多药耐药,增强了癌细胞对化疗药物的敏感性。由于 RNAi 独特的作用

机制,在肿瘤的基因治疗方面已显示了诱人的前景,并且肿瘤细胞产生耐药机制涉及多基因联合作用,因此,我们下一步将致力于研究RNA靶向干扰和多基因同步RNA干扰联合研究针对产生不同耐药机制的siRNA以获得更高效的逆转耐药治疗效果。

参考文献:

[1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.

[2] Loe D W, Deeley R G, Cole S P. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP[J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(6): 945-957.

[3] Lautier D, Canitor Y, Deeley R G, *et al*. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene[J]. Biochem Pharmacol, 1996, 52(7): 967-977.

[4] Lagas J S, Vlaming M L, van-Tellingen O, *et al*. Multidrug resistance protein 2 is an important determinant of paclitaxel pharmacokinetics[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 6125-6132.

[5] Choi H K, Yang J W, Roh S H, *et al*. Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(2): 293-303.

[6] 陈 琳, 严律南, 苟兴华, 等. 重组腺病毒介导MRP反义RNA逆转人肝癌细胞多药耐药表型的体外实验研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(38): 2719-2723.

[7] Folmer Y, Schneider M, Blum H E, *et al*. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-ABCC2 antisense constructs[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(11): 875-884.

[8] Materna V, Stege A, Surowiak P, *et al*. RNA interference-triggered reversal of ABCC2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348(1): 153-157.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)12-1182-01

海军某舰艇部队胃食管反流病流行病学抽样调查

崔立红,杨云生 (解放军总医院消化内科,北京 100000)

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease,GERD)系指胃内容物反流入食管,引起不适症状和(或)并发症的一种疾病。GERD分为非糜烂性反流病(NERD)、糜烂性食管炎(EE)和Barrett食管(BE)3种类型[1]。鉴于海军舰艇人员群体生活作训特点属高危人群,故对其进行调研。

1 对象与方法

调查方法:采取多级分层随机整群抽样方法,对2007年1-5月海军舰艇部队现役军人进行随机抽样调查。共抽取海军舰艇人员1 981例,均为男性,年龄17~38岁,平均22.5岁;服役时间1~21年,平均4.6年。体健,无冠心病、心绞痛病史。对随机抽样人员进行面访式填表,调查资料在Epid. Data软件中采用双校对双录入方式进行录入。

GERD的诊断标准:根据2006年加拿大蒙特利尔的共识诊断GERD,典型症状包括烧心、反流、咽部异物感等。根据GERD程度,分为偶有症状(每天1~5次)、常有症状(每天>5次)2种。致病因素包括吸烟(每天≥10支)、饮酒(每天≥100 g)、饮浓茶(每天≥1 500 ml)。

统计学处理:采用SPSS 15.0统计软件行χ^2检验。

基金项目:海军后勤部卫生部科研计划项目(07WTO01)
Supported by the Scientific Research Project by Health Department of Naval Logistics Department (07WTO01)

作者简介:崔立红,女,河南省郑州市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事功能性胃肠疾病、肝胆胰疾病等方面的研究。电话:(010)66958125

通信作者:杨云生,电话:(010)66939747

收稿日期:2008-03-11;**修回日期**:2008-04-11

2 结果

2.1 舰艇人员与普通人群GERD发病情况比较

本研究显示海军舰艇人员GERD患病率(34.12%)显著高于普通人群(16.7%,$P<0.01$);同时,舰艇人员偶有症状、常有症状及反流性食道炎(RE)的患病率(21.45%、10.30%、2.37%)显著高于普通人群(8.97%、5.77%、1.92%)($P<0.01$)。

2.2 GERD患病率与各危险因素的关系

在危险因素的流行病调查中,吸烟、饮酒、高脂饮食、喝浓茶与GERD关系最为密切,有此嗜好的人员患病率(25.85%、22.11%、24.89%、10.20%)显著高于忧郁、晕船人员患病率(2.42%、3.74%)($P<0.05$)。

2.3 GERD患者病情与各危险因素的关系

研究显示偶有症状患者吸烟因素比例最高;常有症状及RE患者饮酒和高脂饮食2个因素比例显著高于其他因素($P<0.05$)。RE中虽然忧郁症状比例较高,但因例数少,不能进行比较(表1)。

表1 舰艇人员GERD患者病情与致病因素关系[例数(%)]

危险因素	例数	偶有症状	常有症状	RE
吸烟	512	396(77.34)	92(17.97)	24(4.69)
饮酒	438	305(69.63)	101(23.06)[a]	32(7.31)[a]
浓茶	202	156(77.23)	36(17.82)	10(4.95)
高脂饮食	493	346(70.18)	116(23.53)[a]	31(6.29)[a]
忧郁	48	35(72.92)	9(18.75)	4(8.3)
晕船	74	51(68.92)	20(27.3)	3(4.05)

a: $P<0.05$,与其他各危险因素比较

(下转1192页)