

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.05.007

MDR1 基因下调逆转人白血病阿霉素耐药药细胞株 K562/ADM 的耐药性

魏玲¹, 宋现让¹, 孙菊杰², 王兴武¹, 宋宝¹, 郑燕¹

Drug Resistance Reversal of Doxorubicin-resistant Human Leukemia Cell Line K562/ADM through Down-regulating MDR1 Gene

WEI Ling¹, SONG Xian-rang¹, SUN Ju-jie², WANG Xing-wu¹, SONG Bao¹, ZHENG Yan¹

1. Cancer Research Center, Shandong Tumor Hospital, Ji'nan 250117, China, 2. Department of Pathology

Abstract: Objective To explore the effect of shRNA targeted to multidrug resistance gene 1 (MDR1) by RNA interference (RNAi) on drug resistance of doxorubicin-resistant human leukemia cell line K562/ADM. **Methods** The RNAi plasmid of pENTRTM/U6-MDR1, targeting to human MDR1 gene, was transfected into doxorubicin-resistant human leukemia cell line K562/ADM and parental cell line K562. After 48h transfection, MDR1 mRNA level was determined by real time RT-PCR. The expression and function of P-gp protein was analyzed by flow cytometry. Drug resistance of cells was detected by MTT assay. **Results** Compared with non-transfected cells, MDR1 mRNA and expression levels and function of P-gp protein in cells of pENTRTM/U6-MDR1 group decreased significantly ($P < 0.05$). The resistance on doxorubicin was decreased dramatically ($P < 0.05$). **Conclusion** The resistance on doxorubicin of human doxorubicin-resistant leukemia cells was reversed by MDR1 gene down-regulating.

Key words: Leukemia; Multidrug resistance gene 1 (MDR1); RNA interference; Drug resistance

摘要:目的 探讨 RNA 干扰 (RNAi) 人 MDR1 基因对人白血病阿霉素耐药细胞株 K562/ADM 耐药性的影响。**方法** 应用针对人 MDR1 基因的 RNAi 质粒 pENTRTM/U6-MDR1 转染人白血病阿霉素耐药细胞株 K562/ADM 和亲本细胞株 K562, 48 h 后实时荧光定量 PCR 检测 MDR1 mRNA 表达, 流式细胞术检测 P-gp 蛋白表达和 P-gp 功能, MTT 法检测细胞对 ADM 的耐药性。**结果** 与未转染细胞相比, K562/ADM 耐药细胞 pENTRTM/U6-MDR1 组的 MDR1 mRNA 和 P-gp 蛋白表达和功能均显著下降 ($P < 0.05$), 对阿霉素的耐药性显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** MDR1 基因下调可逆转人白血病阿霉素耐药细胞株对阿霉素的耐药性。

关键词: 白血病; MDR1 基因; RNA 干扰; 耐药性

中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)05-0515-04

0 引言

化疗是白血病的主要治疗手段之一, 但多药耐药 (MDR) 的存在常常导致化疗效果不理想甚至失败。多药耐药基因 1 (Multidrug resistance 1, MDR1) 是目前研究较多的耐药机制之一, 其 mRNA 及蛋白表达增加已见于许多人类肿瘤, 已被公认为是介导 MDR 最典型的途径^[1-2]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是双链 RNA 分子诱导细胞内与其序列同源的基因 mRNA 降解而引起的

转录后基因表达抑制现象, 具有高效、特异等特点^[3]。本研究应用已构建的针对 MDR1 基因的 RNAi 质粒转染人白血病细胞 K562 (亲本细胞) 和相应的耐阿霉素细胞株 K562/ADM (耐药细胞), 从 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达、耐药性等方面比较两者差异, 为通过阻断 MDR1 基因表达逆转肿瘤多药耐药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人白血病细胞株 K562 和相应耐阿霉素细胞 K562/ADM 自山东省医学科学院引进。细胞在含 10% FBS (Hyclone 公司) 的 RPMI 1640 (Gibco 公司) 培养液 (含 100 u/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉

收稿日期: 2008-09-27; 修回日期: 2009-06-11

作者单位: 1. 250117 济南, 山东省肿瘤医院基础研究中心, 2. 病理科

作者简介: 魏玲 (1972-), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事肿瘤细胞分子生物学的研究

素)中于 37 °C、5% CO₂ 培养, 2~3 d 传代一次。K562/ADM 培养时需加 0.1 g/L 的 ADM 以维持耐药性。实验前无药培养 1 周。

1.2 主要试剂

针对人 MDR1 基因的 RNAi 质粒 pENTRTM/U6-MDR1 由本室构建^[4]。Lipofectamine 2000TM 脂质体转染试剂、TRIZOL 和 Opti-MEM[®] I 培养液为 Invitrogen 公司产品。阿霉素 (ADM) 为浙江海门制药厂产品。MDR1 和内参照基因 β -actin 上、下游引物均由上海生物工程有限公司合成。One Step SYBR PrimeScriptTM RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。PE 标记鼠抗人 P-gp 单克隆抗体 17F9 购自 BD Biosciences 公司。罗丹明 123 (Rh123) 和 MTT 均为 Sigma 公司产品。

1.3 转染

将对数生长期细胞密度调整为 2×10^5 /ml, 6 孔板中每孔接种 2 ml。37 °C、5% CO₂ 培养 24 h, 按照 Lipofectamine 2000 说明书方法转染细胞, 4 h 后更换培养液为含 10% 胎牛血清的新鲜 RPMI 1640 培养液。K562 和 K562/ADM 细胞转染 pENTRTM/U6-MDR1 后分别命名为 K562/RNAi 和 K562/ADM/RNAi, 每组 3 复孔。48 h 后收集细胞检测 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达。

1.4 实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 检测 MDR1 mRNA 表达

按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA, 调 RNA 浓度至 40 ng/ μ l, -70 °C 冰箱保存。FQ-PCR 采用一步法。MDR1 引物根据 Genbank 提供的基因序列, 按照引物设计软件 (Primer express) 设计。MDR1 上游引物 (FP) 为 5'-CATTGGTGTGGT-GAGTCAGGAA-3', 下游引物 (RP) 5'-TCT-CAATCTCATCCATGGTGACAT-3'。 β -actin 引物为: FP: 5'-CTTAGTTGCGTTACACCCTTTC-3'; RP: 5'-AAACTGGAACGGTGAAGGT-3'。定量 PCR 反应体系为 $2 \times$ one step SYBR Buffer 12.5 μ l, TaKaRa Ex Taq 0.5 μ l, PrimeScriptTM RT Enzyme Mix 0.5 μ l, RNA 100 ng, 正反向引物各 0.5 μ l, 总体积 25 μ l。应用 ABI PRISM 7000 系统进行 RT-PCR 测定, 扩增条件为: 50 °C 2 min, 95 °C 15 min 进行反转录反应; 95 °C 15s, 60 °C 1 min, 40 个循环后进行 PCR 反应。每一标本设 3 复孔。扩增结束后采用 SDS 软件分析, 计算 Ct 值和 Δ Ct。 Δ Ct = Ct_{MDR1} - Ct _{β -actin}; $\Delta\Delta$ Ct = 实验细胞 Δ Ct - 对照细胞 Δ Ct。如对照组 MDR1 mRNA 表达水平为 1, 则其他试验组的相对表达水平为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.5 流式细胞仪检测 P-gp 表达

收集细胞, PBS 漂洗后调细胞浓度为 1×10^6 /ml。设 a、b 两管, 每管加细胞悬液 100 μ l, 分别加入 P-gp 同型对照和 P-gp 单抗各 10 μ l, 室温避光反应 30 min 后待检。流式细胞仪检测采用 Cell Quest 软件 FSC/SSC 设门获取 10 000 个细胞, 蛋白表达以阳性细胞百分率表示。

1.6 流式细胞仪检测 P-gp 功能

调细胞浓度为 1×10^6 /ml, 加入 Rh123 (2 μ g/ml), 37 °C 孵育 45 min, 冷 PBS 洗 2 遍, 0.5 h 内检测。

1.7 药物敏感性检测

采用 MTT 法。收集转染 48 h 后的亲本细胞和耐药细胞, 调细胞浓度为 2×10^5 /ml, 96 孔板每孔加入 95 μ l。ADM 浓度依据预实验结果确定。对 K562 和 K562/RNAi 细胞, ADM 的浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μ g/ml; 对 K562/ADM 和 K562/ADM/RNAi 细胞, ADM 的浓度为 0、1、2、4、8、16 μ g/ml。ADM 加药体积每孔 5 μ l。药物作用细胞 48 h 后每孔加入 MTT (5 mg/ml) 10 μ l, 4 h 后每孔加 10% SDS (含 0.01 NHCl) 100 μ l, 24 h 后应用酶标仪 (Bio-rad 680 型) 在检测波长 570 nm、参考波长 630 nm 条件下测吸光度 (A), 计算细胞生长抑制率 (IR)。 $IR(\%) = (1 - \text{实验孔 A 值} / \text{对照孔 A 值}) \times 100\%$, 计算 50% 抑制浓度 (IC₅₀)。耐药倍数 = 耐药细胞 IC₅₀ / 亲本细胞 IC₅₀。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 10.0 统计软件。两样本间采用 t 检验。

2 结果

2.1 RNAi 对细胞 MDR1 mRNA 表达的影响

K562/RNAi 细胞 MDR1 mRNA 表达较 K562 下降 82%; K562/ADM 细胞的 MDR1 mRNA 表达为 K562 细胞的 11 倍, 而 K562/ADM/RNAi 细胞的 MDR1 mRNA 表达较 K562/ADM 耐药细胞显著下降, 但仍高于 K562 细胞 MDR1 mRNA 表达, 见表 1。

表 1 RNAi 对细胞 MDR1 mRNA 表达的影响 (n = 9)

Table 1 The influence of RNAi on the expression of MDR1 mRNA in cells (n = 9)

Cell line	MDR1-Ct ($\bar{x} \pm s$)	β -actin-Ct ($\bar{x} \pm s$)	MDR1 mRNA level ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
K562	25.56 \pm 2.08	21.29 \pm 1.40	1.00
K562/RNAi	28.28 \pm 1.97	21.53 \pm 1.53	0.18*
K562/ADM	21.67 \pm 1.59	20.86 \pm 1.64	11.00*
K562/ADM/RNAi	24.09 \pm 1.88	21.94 \pm 1.71	4.35* Δ

Note: * : P < 0.05, vs. K562 group; Δ : P < 0.05, vs. K562/ADM group

2.2 RNAi 对细胞 P-gp 表达的影响

由表 2 可见, K562 和 K562/RNAi 细胞 P-gp 表达差异无统计学意义。而 K562/ADM 细胞 P-gp 表达远高于 K562 细胞 ($P < 0.05$), 而 K562/ADM/RNAi 细胞的 P-gp 表达显著下降 ($P < 0.05$), 但仍高于亲本 K562 细胞 ($P < 0.05$)。四种细胞 P-gp 表达的流式直方图见图 1~4。

表 2 RNAi 对细胞 P-gp 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)
Table 2 The influence of RNAi on the expression of P-gp protein in cells ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

Cell line	P-gp level
K562	1.3 ± 0.2
K562/RNAi	1.1 ± 0.2
K562/ADM	56.3 ± 2.9*
K562/ADM/RNAi	20.7 ± 2.3* [△]

Note: * : $P < 0.05$, vs. K562 group; [△] : $P < 0.05$, vs. K562/ADM group

2.3 RNAi 对细胞 P-gp 功能的影响

K562 内 Rh123 的荧光强度与 K562/RNAi 细胞无显著性差异。而 K562/ADM 细胞 Rh123 的荧光强度显著低于 K562 ($P < 0.05$), K562/ADM/RNAi 细胞 Rh123 的荧光强度较 K562/ADM 细胞显著增加, 但低于 K562 细胞 ($P < 0.05$), 见表 3。四株细胞 P-gp 功能的流式直方图见图 5~8。

表 3 RNAi 对细胞 P-gp 功能的影响 ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

Table 3 The influence of RNAi on the function of P-gp in cells ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

Cell line	Rh123 retention
K562	93.7 ± 3.5
K562/RNAi	91.8 ± 3.4
K562/ADM	20.4 ± 2.1*
K562/ADM/RNAi	76.1 ± 3.2* [△]

Note: * : $P < 0.05$, vs. K562 group; [△] : $P < 0.05$, vs. K562/ADM group

2.4 RNAi 对细胞株阿霉素耐药性的影响

K562、K562/RNAi、K562/ADM 和 K562/ADM/RNAi 细胞对 ADM 的 IC_{50} 值分别为 0.35、0.34、1.46 和 0.75 $\mu\text{g/ml}$, 见表 4、5。与 K562 细胞相比, K562/ADM 的耐药倍数为 4.17, K562/ADM/RNAi 的耐药倍数为 2.14。K562/ADM/RNAi 对 ADM 的耐药性较 K562/ADM 细胞明显下降。

3 讨论

RNAi 用于基因治疗时, 由于 siRNA 易被 RNase 降解, 且体外合成 siRNA 的量也不能满足体内实验的要求, 所以载体介导的 RNAi 成为主要方式^[5-6]。应用人工合成的 siRNA 和质粒载体体外转染 k562/ADM 耐药细胞均已见报道^[7-8], 但迄今尚未见应用慢病毒入门克隆质粒载体 pENTRTM/U6-

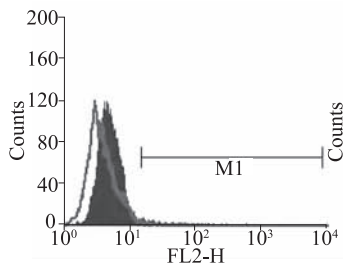


图 1 K562 细胞 P-gp 表达

Figure 1 Expression of P-gp on K562 cells

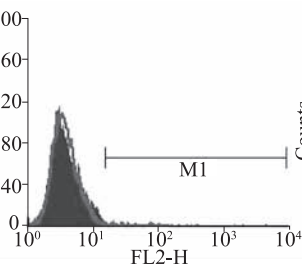


图 2 K562/RNAi 细胞 P-gp 表达

Figure 2 Expression of P-gp on K562/RNAi cells

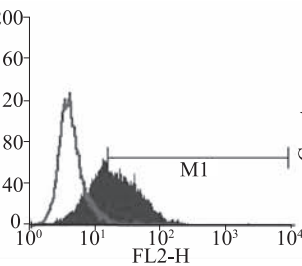


图 3 K562/ADM 细胞 P-gp 表达

Figure 3 Expression of P-gp on K562/ADM cells

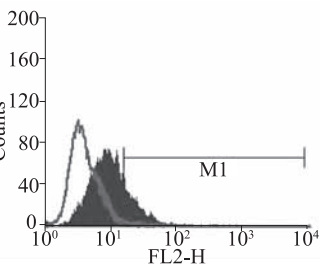


图 4 K562/ADM/RNAi 细胞 P-gp 表达

Figure 4 Expression of P-gp on K562/ADM/RNAi cells

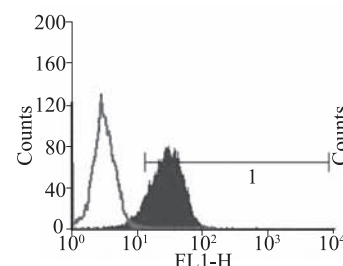


图 5 K562 细胞 Rh123 的滞留

Figure 5 Retention of Rh123 in K562 cells

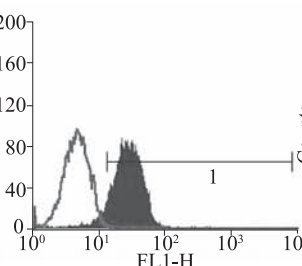


图 6 K562/RNAi 细胞 Rh123 的滞留

Figure 6 Retention of Rh123 in K562/RNAi cells

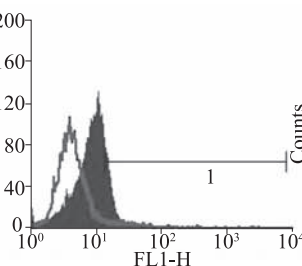


图 7 K562/ADM 细胞 Rh123 的滞留

Figure 7 Retention of Rh123 in K562/ADM cells

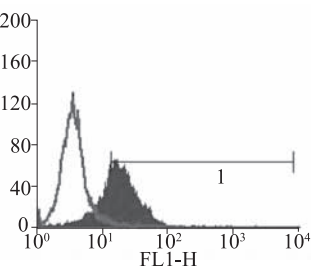


图 8 K562/ADM/RNAi 细胞 Rh123 的滞留

Figure 8 Retention of Rh123 in K562/ADM/RNAi cells

表 4 K562 和 K562/RNAi 细胞对 ADM 的药物敏感性 (n=9)

Table 4 Drug sensitivity on ADM in K562 and K562/RNAi cells (n=9)

ADM dose (μg/ml)	K562		K562/RNAi	
	A($\bar{x} \pm s$)	IR(%)	A($\bar{x} \pm s$)	IR(%)
0	0.76 ± 0.03	0	0.85 ± 0.04	0
0.1	0.72 ± 0.04	5.26	0.79 ± 0.03	7.06
0.2	0.59 ± 0.05	22.37*	0.64 ± 0.02	24.71*
0.4	0.28 ± 0.02	63.16*	0.30 ± 0.03	64.71*
0.8	0.07 ± 0.01	90.79*	0.09 ± 0.01	89.41*
1.6	0.04 ± 0.01	94.74*	0.05 ± 0.01	94.12*

Note: *: P < 0.05, vs. 0 dose group

表 5 K562/ADM 和 K562/ADM/RNAi 细胞对 ADM 的药物敏感性 (n=9)

Table 5 Drug sensitivity on ADM in K562/ADM and K562/ADM/RNAi cells (n=9)

ADM dose (μg/ml)	K562/ADM		K562/ADM/RNAi	
	A($\bar{x} \pm s$)	IR(%)	A($\bar{x} \pm s$)	IR(%)
0	1.29 ± 0.03	0	1.18 ± 0.03	0
1	0.75 ± 0.04	41.86*	0.56 ± 0.04	52.54*
2	0.59 ± 0.03	54.26*	0.43 ± 0.03	63.56*
4	0.38 ± 0.03	70.54*	0.25 ± 0.02	78.81*
8	0.32 ± 0.02	75.19*	0.17 ± 0.02	85.59*
16	0.22 ± 0.01	82.95*	0.09 ± 0.01	92.37*

Note: *: P < 0.05, vs. 0 dose group

MDR1 同时转染 K562/ADM 耐药细胞和相应亲本细胞的研究。为详细比较 RNAi 对耐药细胞和相应亲本细胞的作用差异,本研究从基因 mRNA 水平、P-gp 表达和功能、药物敏感性等方面,全面观察了 RNAi 的生物学效应。结果显示两者转染细胞的 MDR1 mRNA 水平较相应未转染细胞显著下降,提示 MDR1 基因受到抑制。应用流式细胞术检测 P-gp 表达,发现 K562 和 K562/RNAi 细胞均无 P-gp 表达, K562/ADM 细胞 P-gp 表达水平最高,而 K562/ADM/RNAi 细胞 P-gp 表达显著低于 K562/ADM 细胞,但仍高于 K562 细胞,说明转染后的耐药细胞仍有一定程度 P-gp 表达。由于细胞膜上的 P-gp 可将染料 Rh123 泵出细胞外,导致细胞内 Rh123 的蓄积减少,细胞荧光强度下降,即细胞膜上 P-GP 功能与细胞内蓄积的 Rh123 呈反变关系,因此借助 Rh123 试验可间接评价 P-gp 功能。本研究结果显示,细胞膜上几乎无 P-gp 表达的 K562 和 K562/RNAi 细胞均有大量 Rh123 滞留,而高表达 P-gp 的耐药细胞 Rh123 滞留较少。应用质粒转染后,耐药细胞 P-gp 表达下降, Rh123 滞留增加,但仍

低于 K562 细胞。在药物敏感性上,我们发现 K562 和 K562/RNAi 细胞对 ADM 的敏感性非常接近。与亲本 K562 细胞相比,耐药 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性最低,而 K562/ADM/RNAi 细胞对 ADM 的敏感性虽不及 K562,但已较 K562/ADM 细胞明显增加,显示 MDR1 基因下调后耐药细胞系对 ADM 的耐药性得到一定程度的逆转。

由于质粒介导 RNAi 具有局限性,如在不同宿主细胞质粒的转染效率具有差异以及持续时间短等,不适宜用作体内基因治疗研究^[5]。应用病毒载体可克服此缺点,目前已有使用腺病毒(adenovirus)、逆转录病毒(retrovirus)等为载体介导 RNAi 的研究报道^[9-11]。我们欲以慢病毒为载体实现 RNAi 以获得更高效的逆转耐药治疗效果,相关研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate [J]. *Leukemia*, 2004, 18(3):401-408.
- [2] Kisucka J, Barancik M, Bohacova V, et al. Reversal effect of specific inhibitors of extracellular signal regulated protein kinase pathway on P-glycoprotein mediated vincristine resistance of L1210 cells[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2001, 20(4):439-444.
- [3] Cherr M, Morgan MA, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(3):245-256.
- [4] 孙桂云, 王玉玉, 魏玲. MDR1 RNAi 表达克隆的质粒构建[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(9):662-665.
- [5] Wang QZ, Lv YH, Diao Y, Xu R. The design of vectors for RNAi delivery system [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(13):1327-1340.
- [6] Paddish PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(8):948-958.
- [7] 彭智, 冯文莉, 肖志坚, 等. RNAi 对白血病细胞 mdr-1 基因和多药耐药表型的影响 [J]. *肿瘤*, 2006, 26(12):1074-1077.
- [8] 顾玲, 刘霆, 龚玉萍, 等. RNA 干扰逆转白血病细胞耐药性的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2007, 38(1):45-48.
- [9] Sumimoto H, Kawakami Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research [J]. *Future Oncol*, 2007, 3(6):655-664.
- [10] Jiang G, Li J, Zeng Z, Xian L. Lentivirus-mediated gene therapy by suppressing survivin in BALB/c nude mice bearing oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(4):435-440.
- [11] Numnum TM, Makhija S, Lu B, et al. Improved anti-tumor therapy based upon infectivity-enhanced adenoviral delivery of RNA interference in ovarian carcinoma cell lines [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(1):34-41.

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]