

SGC-7901/DDP 胃癌细胞中 *MDR1* miRNA 干扰载体构建及靶点筛选

Construction of Interfering Vectors for *MDR1* MiRNA in SGC-7901/DDP Gastric Cancer Cell and Screening for Target Spots // GUO Jian-xin, YUAN Guang-bo, CHEN Mi, et al.

郭建新, 袁光波, 陈 蜜, 徐正阳, 娄鹏荣, 陶庆松
(宁波市鄞州人民医院, 浙江 宁波 315040)

摘 要: [目的] 筛选胃癌细胞多药耐药基因 1(*MDR1*) 的有效 RNA 干扰靶点, 并进行药物敏感度验证。[方法] 设计并合成 3 条干扰靶点 Oligo 序列, 连接入线性化的 pcDNA6.2 GW/EmGFP-miR 载体中, 瞬时转染 SGC-7901/DDP 胃癌细胞, 通过 qPCR 相对定量法筛选出最佳干扰序列, 将最佳干扰质粒转染细胞后, 采用 CCK-8 试剂盒进行药物敏感度检测。[结果] 通过 qPCR 筛选出相比阴性对照组干扰效果最佳的 RNA 干扰(RNAi)序列, *MDR1* 的 mRNA 表达水平抑制了 25%±1%。*MDR1* 经 RNA 干扰后, 药物敏感度实验表明耐药细胞株对顺铂的敏感度增强, IC₅₀ 值相比空白对照组和阴性对照组分别下降 0.4 μg/ml, 0.5 μg/ml。[结论] 成功筛选出一个 *MDR1* 的 RNA 干扰靶点, *MDR1* 经 RNA 有效干扰后, 耐药细胞株对顺铂的敏感性增强。

主题词: SGC-7901/DDP 胃癌细胞; 多药耐药基因; miRNA; 实时定量基因扩增; 荧光检测系统; RNA 干扰

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2012)07-0520-04

多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 即对结构、性质、作用机制完全不同的药物产生的交叉耐药现象, 是当前肿瘤临床化疗工作中亟待解决的难题。P-糖蛋白(P-gp)介导的耐药机制是多药耐药的重要分子基础, P-gp 由多药耐药基因 1(*MDR1*) 编码, 是一种 ATP 依赖性的药物泵系统, 可将进入细胞内的药物泵出细胞^[1]。以往采用钙通道阻断剂、反义寡核苷酸、抗体等方式逆转 *MDR1*^[2,3], 而最新的 RNA 干扰(RNAi)技术对肿瘤细胞 *MDR1* 的 mRNA 表达进行干扰, 可以达到恢复其药物敏感度的作用^[4]。有实验表明胃癌对铂类药的耐药机制可能与其诱导 *MDR1* 表达上调有关^[5]。本研究通过模拟体内 RNA 干扰通路, 构建了 3 个携带 miRNA 干扰片段的载体, 通过脂质体瞬时转染 SGC-7901/DDP 胃癌耐药细胞株, 采用 qPCR 法筛选出最佳干扰靶点, 并通过药物敏感度试验进一步验证最佳靶点的干扰效果。

基金项目: 浙江省宁波市鄞州区农业与社会发展科技项目(鄞科 2009-61)
通讯作者: 袁光波, 主治医师, 硕士; 宁波市鄞州人民医院肿瘤放疗中心, 浙江省宁波市百丈东 251 号(315040); E-mail: yuanguangbo@sina.com。
收稿日期: 2012-02-06; **修回日期:** 2012-04-15

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

线性化 pcDNA6.2 GW/EmGFP-miR 干扰载体、阴性对照质粒 pcDNA6.2-miR-NC-EmGFP(载体插入无关序列为 5'-GAAATGTACTGCCGCTGGAGACG-TTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACAT-TT-3')、Lipofectamine2000、SYBR Green 荧光定量检测试剂盒均为 Invitrogen 产品; 小抽质粒提取试剂盒为 Axygen 公司产品; 壮观霉素为 Sigma 产品; T4 DNA Ligase、M-MLV 为 Fermentas 产品; 干扰靶点的 Oligo 序列以及引物由本实验室设计, 引物合成和测序均由上海博尚完成。SGC-7901/DDP 耐药细胞株购自南京凯基生物技术有限公司; DMEM、小牛血清均为 Gibco 产品; CCK-8 试剂为日本同仁化学研究所产品; 大肠杆菌 DH 5α 为本实验室保存; 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。Real-time PCR 仪为 Eppendorf 公司产品。

1.2 *MDR1* 的 RNA 干扰载体构建及测序验证

采用 Invitrogen 在线 RNAi 设计软件 BLOCK-iTTM RNAi Designer, 输入 *MDR1* 基因的 CDS 序列

表 1 化学合成 Oligo 序列信息

名 称	化学合成 Oligo 序列信息
MDR1-1-F	5'-TGCTGAATATTATCTGGTTTGTGCCCCGTTTGGCCACTGACTGACGGGCACAAACAGATAATATT- 3'
MDR1-1-R	5'-CCTGAATATTATCTGTTGTGCCCCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGGGCACAAACCAGATAATATTC -3'
MDR1-2-F	5'-TGCTGCAACCAGGGTGTCAAATTTATGTTTGGCCACTGACTGACATAAAATTCACCCCTGGTTG-3'
MDR1-2-R	5'-CCTGCAACCAGGGTGAAATTTATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATAAAATTTGACACCCTGGTTGC-3
MDR1-3-F	5'-TGCTGAAACGATGAGCTATCACAATGGTTTGGCCACTGACTGACCATTTGTGAGCTCATCGTTT-3'
MDR1-3-R	5'-CCTGAAACGATGAGCTCACAATGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCATTTGTGATAGCTCATCGTTTC-3'

(NM_000927.3), 选择星级最高的 3 个核苷酸片段作为靶序列, 经 Blast 排除其非特异同源性质后, 合成 3 对 F/R 两两互补的 Oligo 序列, 见表 1。

经退火后 F 链与 R 链两两形成含有黏性末端的 Oligo 双链, 与已线性化的 pcDNA6.2 GW/EmGFP-miR 连接, 转化感受态大肠杆菌 DH 5 α , 涂布在含 50 μ g/ml 壮观霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。第 2d 挑取菌斑接入含 50 μ g/ml 壮观霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜。次日抽提质粒, 分别命名为 pcDNA6.2-MDR1-miR-1、pcDNA6.2-MDR1-miR-2 和 pcDNA6.2-MDR1-miR-3, 送上海博尚测序验证。

1.3 干扰质粒瞬时转染 SGC-7901/DDP 耐药细胞

于转染前 1d, 利用胰蛋白酶消化 SGC-7901/DDP 耐药细胞, 接入 24 孔板, 分别使细胞置于 500 μ l 含 1640+10%FBS 培养基 (1%P/S+1%Glutamax 培养, 另外添加 0.5 μ g/ml 的 CDDP), 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养。转染前细胞调整至融合度 80%。转染当天, 从 SGC-7901/DDP 细胞中移除培养基, 换新鲜的 400 μ l 培养基 (不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 孵育。配制转染混合物: A 管: 分别取干扰载体 pcDNA6.2-MDR1-miR 及阴性对照 pcDNA6.2-miR-NC 与 1640 培养基混匀; B 管: 取 Opti-MEM 与 Lipo 2000 混匀。室温静置 5min 后, 分别取 B 管溶液加入 A 组各管中混合, 室温孵育 20min。将上述混合液分别滴加到 24 孔板的 SGC-7901/DDP 细胞中, 轻轻摇匀细胞培养板, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育过夜, 然后换新鲜培养基。转染 48h 后, 荧光显微镜观察细胞的转染效率。

1.4 qPCR 检测 MDR1 的表达

转染 48h 后收取细胞培养上清, Trizol 裂解细胞, 抽提 RNA, 检测 RNA 浓度及纯度。反转录获得的 cDNA 作为模板, 目的基因 MDR1 扩增片段长度为 89bp (上游引物 5'-TGTGGGAAGAGCACACTGG-3', 下游引物 5'-CGCTTTATTTCTTTGCCATCA-3'); 内参基因 ACTB 扩增片段长度为 208bp (上游引物 5'-

TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3', 下游引物 5'-CAGG-AGGAGCAATGATCTTGAT-3'), 通过 RT-PCR 预实验摸索各引物的 PCR 扩增条件。在 Eppendorf Realplex 上以 SYBR Green 法进行 qPCR 分析各基因的表达量。PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 2min; (95 $^{\circ}$ C 15s, 59 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 20s) $\times$ 40 Cycles。PCR 结束后, 进行溶解曲线实验, 升温温度从 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C。用 $\Delta\Delta$ CT 法进行各基因表达的相对定量分析。

1.5 耐药细胞的 DDP 敏感度 (IC₅₀ 值) 检测

以空白 SGC-7901/DDP 耐药细胞作为对照, 将阴性对照质粒、最佳干扰靶点质粒转染 SGC-7901/DDP 耐药细胞后 48h, 3 组细胞加入 DDP 终浓度分别为: 0.5 μ g/ml、0.8 μ g/ml、1.0 μ g/ml、1.5 μ g/ml、2.0 μ g/ml 和 2.5 μ g/ml, 药物处理 48h 后换液, 每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂, 细胞培养箱中孵育 3h, 在 450nm 处进行 OD 值检测。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组计量资料比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 干扰载体构建

测序结果经 Sequencher 软件进行序列比对证明 3 个载体的插入序列完全正确, 干扰载体构建成功。

2.2 干扰载体转染

3 个 MDR1 干扰质粒 (均含有 GFP 荧光标记) 瞬时转染 SGC-7901/DDP 胃癌耐药株, 转染效率 50% 左右, 见图 1。

2.3 qPCR 检测细胞转染后的干扰效率

qPCR 检测结果显示含干扰序列 MDR1-miR-1 的质粒干扰效率最高, 经细胞转染后 MDR1 mRNA

表达量降低 25%±1%,明显低于阴性对照质粒 ($P<0.05$),证明此序列干扰了相对最佳靶点,实验结果见图 2。

2.4 药物敏感度实验

待测样品在 450nm 处的 OD 值为测量值,空白培养基在 450nm 处 OD 值为空白 OD 值,最终 OD

值=测量 OD 值-空白 OD 值。鉴于质粒转染可能对细胞生长产生干扰作用,为减少其对药物抑制率的影响,本实验各组均在组内设对照孔以计算各组的抑制率(耐药细胞基础培养中已加入 0.5μg/ml 的顺铂),将 0.5μg/ml 时的最终 OD 值作为各组对照孔最终 OD 值。抑制率(%)=(各组对照孔最终 OD 值-各

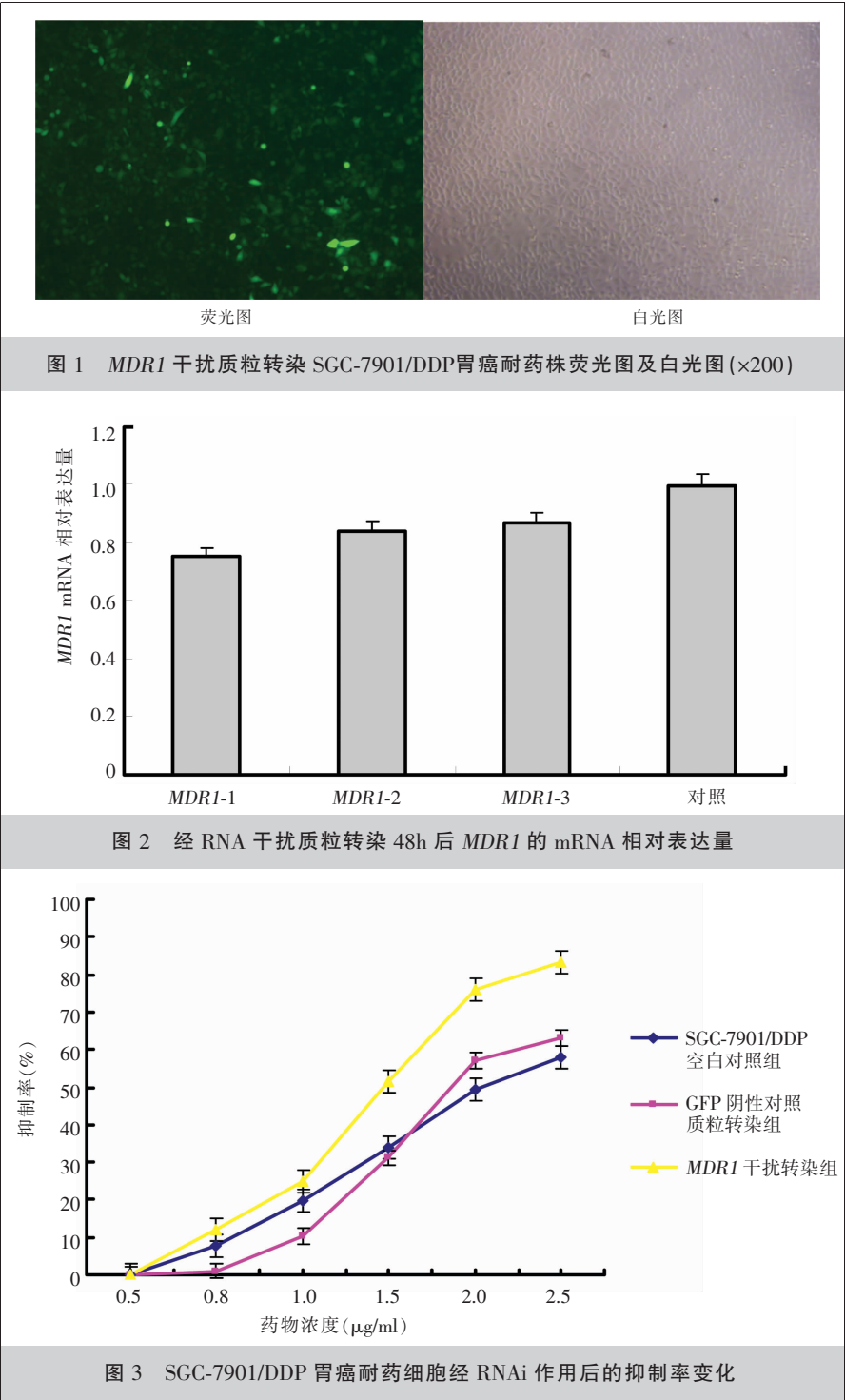
组实验孔最终 OD 值)/各组对照孔最终 OD 值×100%。计算后得到抑制率曲线见图 3。

由图 3 可见,SGC-7901/DDP 空白细胞组以及转染 GFP 阴性对照质粒细胞组的 IC₅₀ 值分别为 2.0μg/ml 和 1.9μg/ml,而当 SGC-7901/DDP 胃癌耐药细胞转染 MDR1-miR-1 质粒后,IC₅₀ 值为 1.5μg/ml,DDP 耐药性明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

在临床工作中,多药耐药现象是肿瘤治疗的重大障碍。RNAi 技术是近年来基因治疗的重大突破,采用 RNA 干扰片段靶向抑制多药耐药基因,可有效逆转肿瘤细胞的耐药性^[6,7],RNAi 为较好解决化疗耐药问题提供了新的方向。

2001 年 Elbashir 等^[8]首次使用 19~23nt 的双链小分子干扰 RNA,在哺乳动物细胞内成功诱发了转录后基因沉默现象。随后研究人员证明体内 miRNA 具有 RNA 调控作用,这种约 22 个核苷酸的单链小 RNA 通过两种作用方式发挥其生物功能:与靶 mRNA 完全或几乎完全配对时,可以引起靶 mRNA 的剪切反应使 mRNA 降解;在不完全配对时,



则引起靶 mRNA 的翻译抑制^[9]。与 siRNA 不同的是,miRNA 是内源而非外源序列。基于 miRNA 的特点,miRNA 成为继 siRNA 之后 RNA 干扰领域又一种重要的研究手段和实验工具^[10,11]。

本实验中所使用的 RNAi 载体是由 RNA Polymerase II 型启动子 CMV 介导,在可形成 LOOP 结构的干扰靶点两侧加入鼠的 mir-155 侧翼序列^[12],模拟体内前体 miRNA 的合成,能够产生出与其靶位点完全互补的成熟 miRNA,从而使目标基因 *MDR1* 的同源 mRNA 降解,干扰目的基因的表达。另外该载体中的干扰片段可与 EGFP 在同一启动子 CMV 后协同表达,便于对细胞转染效率进行分析。

研究表明,正常胃黏膜、异型增生及未经术前化疗的胃癌黏膜中 *MDR1* 表达强度依次增强;化疗可诱导胃癌细胞 *MDR1* 表达增强^[13]。进一步研究表明 *MDR1* 的单核苷酸多态性与许多恶性肿瘤的发生、预后相关^[14]。本研究通过转染 *MDR1* 干扰质粒至胃癌耐药细胞株并进行 qPCR 筛选,获得 *MDR1* 的有效干扰序列。*MDR1* 基因表达经有效干扰后,该耐药细胞株对顺铂敏感性得到增强。实验结果为后期应用 RNAi 技术逆转肿瘤细胞耐药性的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Germann UA, Pastan I, Gottesman MM. P-glycoproteins: mediators of multidrug resistance [J]. *Semin Cell Biol*, 1993, 4(1): 63-76.
- [2] Mayur YC, Jagadeesh S, Thimmaiah KN. Targeting calmodulin in reversing multidrug resistance in cancer cells [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(12): 1383-1389.
- [3] Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Z, et al. Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320(1): 81-88.
- [4] Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1515-1519.
- [5] 刘凌翔, 葛红梅, 黄普, 等. 铂类药物对胃癌细胞生物学行为和 MDR1 表达的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2010, (10): 1117-1122.
- [6] Nieth C, Priebisch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multi-drug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi) [J]. *FEBS Lett*, 2003, 545(2-3): 144-150.
- [7] 赵澎, 胡微, 张亚卓, 等. RNA 干扰技术逆转神经胶质瘤细胞多药耐药性 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(3): 183-187.
- [8] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [9] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [10] Boden D, Pusch O, Silberman R, et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(3): 1154-1158.
- [11] Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells [J]. *Mol Cell*, 2002, 9(6): 1327-1333.
- [12] Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, et al. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(7): e53.
- [13] 张威, 邹寿椿, 赵大健, 等. 多药耐药相关基因在胃癌组织中的表达及意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2002, 8(2): 76-78.
- [14] 陈徐艰, 王晓光, 沈亦珏, 等. *MDR1* 基因单核苷酸多态性与肝细胞肝癌预后的关系 [J]. *肿瘤学杂志*, 2011, 17(3): 209-211.