

# 靶向mdr1不同位点的siRNA对两种耐药细胞MDR的逆转效果

张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲

张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲, 新乡医学院组织胚胎学教研室 河南省新乡市 453003

张敏, 2008年新乡医学院硕士研究生, 主要从事肿瘤耐药研究.

河南省科技攻关计划基金资助项目, No. 072102310073

作者贡献分布: 此课题由高福莲与张敏设计; 研究过程由张敏、李勇莉及高建凯操作完成; 研究所用试剂及分析工具由高福莲提供; 数据分析由张敏、李勇莉及王国栋完成; 论文由张敏完成.

通讯作者: 高福莲, 教授, 453003, 河南省新乡市金德大道东段, 新乡医学院组织胚胎学教研室. gfl@xxmu.edu.cn

电话: 0373-3029243

收稿日期: 2009-09-23 修回日期: 2009-11-09

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-28

## Reversal effects of siRNAs targeting different regions of the mdr1 gene on multidrug resistance in two drug-resistant tumor cell lines

Min Zhang, Yong-Li Li, Jian-Kai Gao, Guo-Dong Wang, Fu-Lian Gao

Min Zhang, Yong-Li Li, Jian-Kai Gao, Guo-Dong Wang, Fu-Lian Gao, Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Henan Province, No. 072102310073

Correspondence to: Professor Fu-Lian Gao, Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical University, East Jinsui Avenue, Xinxiang 453003, Henan Province, China. gfl@xxmu.edu.cn

Received: 2009-09-23 Revised: 2009-11-09

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of four siRNAs targeting different regions of the multidrug resistance 1 (mdr1 gene) on multidrug resistance (MDR) of SGC7901/VCR and K562/A02 cells.

**METHODS:** Four siRNAs (mdr1si326, mdr1si1513, mdr1si2631 and mdr1si3071) targeting the mdr1 gene were designed and transfected into SGC7901/VCR and K562/A02 cells, respectively. The expression level of mdr1 mRNA was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression

level of P-glycoprotein (P-gp) was detected by immunohistochemistry. The accumulation of intracellular adriamycin (ADR) was examined by flow cytometry. The cell sensitivity to ADR was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

**RESULTS:** The best reversal effects on MDR of SGC7901/VCR cells were achieved with mdr1si326, followed by mdr1si2631, mdr1si3071 and mdr1si1513. Similarly, the best reversal effects on MDR of K562/A02 cells were also achieved with mdr1si326, followed by mdr1si2631, mdr1si3071 and mdr1si1513.

**CONCLUSION:** The four siRNAs exerts similar reversal effects on multidrug resistance of both SGC7901/VCR and K562/A02 cells.

**Key Words:** Small interfering RNA; Multidrug resistance 1 gene; SGC7901/VCR cells; K562/A02 cells; Target site

Zhang M, Li YL, Gao JK, Wang GD, Gao FL. Reversal effects of siRNAs targeting different regions of the mdr1 gene on MDR of siRNA on multidrug resistance in two drug-resistant tumor cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3387-3393

## 摘要

**目的:** 探讨靶向mdr1 4个不同位点的siRNAs对胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02的作用效果.

**方法:** 设计并体外转录合成4条靶向mdr1的siRNAs(mdr1si326、mdr1si1513、mdr1si2631及mdr1si3071), 分别转染SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞, 用RT-PCR和免疫组织化学检测mdr1 mRNA与P-gp的表达, 流式细胞仪检测细胞内阿霉素(ADR)的蓄积, MTT法检测细胞对阿霉素的敏感性.

**结果:** 4条siRNAs对人胃癌细胞SGC7901/VCR mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依

## 背景资料

RNA干扰(RNAi)是21-23个核苷酸(nt)的小分子干扰RNA(siRNA)诱导细胞同源基因mRNA降解, 而特异性抑制基因表达的过程. siRNA是RNAi过程中重要的中间分子, 其的特异性是诱发RNAi的一个重要因素.

## 同行评议者

吴健雄, 教授, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤医腹部外科

**研发前沿**  
RNAi这一特异、有效的技术已应用于肿瘤多药耐药(MDR)等方面的研究。大量研究表明,靶向同一基因不同靶位点的siRNA的作用效果不同,因此有效靶位点的筛选对于RNAi的成功与否十分重要,成为一项研究热点。

次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071及mdr1si1513;对人红白血病细胞K562/A02 mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071及mdr1si1513。

**结论:** 4条siRNAs对SGC7901/VCR和K562/A02两种耐药细胞作用效果趋势相似。

**关键词:** 小干扰RNA; mdr1基因; SGC7901/VCR细胞; K56/A02细胞; 靶位点

张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲. 靶向mdr1不同位点的siRNA对两种耐药细胞MDR的逆转效果. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3387-3393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3387.asp>

## 0 引言

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是21-23个核苷酸(nucleotide, nt)的小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)诱导细胞同源基因mRNA降解而特异性抑制基因表达的过程。这一特异、有效的技术已应用于肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)等方面的研究。siRNA是RNAi过程中重要的中间分子, siRNA的特异性是诱发RNAi的一个重要问题。大量研究表明, 靶向同一基因不同靶位点的siRNA的作用效果不同, 因此有效靶位点的筛选对于RNAi的成功与否十分重要。高福莲 *et al*<sup>[1]</sup>用的4条siRNA之一mdr1si326的靶序列相同于Peng *et al*<sup>[2]</sup>用的三条序列之一si-mdr1-1, 高福莲 *et al*研究显示此条siRNA转染SGC7901/VCR细胞后, mRNA表达水平、细胞内ADR蓄积和ADR耐药性逆转三方面的数据变动和转染前比较有统计学意义; Peng *et al*用此条siRNA转染K56/A02细胞后, 发现mRNA表达、P-gp表达和细胞内柔红霉素蓄积、对ADR的敏感性的转染前后数据变化无统计学意义。上述研究显示靶向同一位点siRNA的作用效果和细胞种类有关系, 靶向不同靶位点的siRNA对不同种类细胞的作用效果趋势如何, 尚未见相关报道。本研究选定并合成靶向mdr1 mRNA不同靶位点的4条siRNAs, 分别转染胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02, 用RT-PCR检测mdr1 mRNA的表达、免疫组织化学检测mdr1蛋白水平的表达、流式细胞仪检测细胞内化疗药物的蓄积、MTT法检测细胞对化疗药物的敏感性, 判断靶向不同位点的siRNAs对不同细胞作用效果的趋势有

无差别, 探讨高效靶点的通用性, 为靶点的选择提供理论资料, 也为siRNA药物研发提供依据, 具有潜在的临床应用前景。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SGC7901细胞由郑州大学基础医学院组胚教研室惠赠, SGC7901/VCR细胞由中国人民解放军第四军医大学西京医院消化病研究所樊代明教授惠赠, K562/A02细胞购自协和血液学研究中心, K562细胞由山东大学血研室惠赠。TRIzol试剂购自Nvitrogen公司, AMV第一链cDNA合成试剂盒和PCR扩增试剂盒均购自上海Sangon公司, DAB显色试剂盒和SABC免疫组织化学染色试剂盒(SA2002)购自武汉Boster公司, 兔抗人P-gp多克隆抗体(Mdr(H-241): sc-8313)购自Santa Cruz公司, CodeBreaker siRNA转染试剂和T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi System购自美国Promega公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA的siRNA的设计和合成:** 参照高福莲<sup>[3]</sup>的研究选取的靶序列, 用T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi System在体外转录分别合成4条siRNAs: mdr1si326, mdr1si1513, mdr1si2631和mdr1si3071。

**1.2.2 siRNAs沉默SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞mdr1效果的检测:** (1)细胞培养: K562/A02和SGC7901/VCR用含10%灭活小牛血清、100 kU/L链霉素、100 kU/L青霉素的RPMI 1640培养基, 置37℃、50 mL/LCO<sub>2</sub>饱和湿度的恒温孵育箱中培养, 培养基中分别含1 mg/L ADR和1 mg/L VCR以维持其耐药性, 实验前2 wk停药。用CodeBreaker siRNA转染试剂, 分别将siRNAs以20 nmoL的终浓度转染SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞。实验分7组。空白对照组: 只加PBS; 转染试剂组: 转染试剂+PBS; mdr1si326组: 转染试剂+mdr1si326; mdr1si1513组: 转染试剂+mdr1si1513; mdr1si2631组: 转染试剂+mdr1si2631; mdr1si3071组: 转染试剂+mdr1si3071; SGC7901或K562组(亲本组): SGC7901细胞或K562细胞+PBS。(2)RT-PCR: 用TRIzol试剂按说明书提取转染48h后的细胞总RNA, 测定RNA的纯度和浓度, 判定RNA的完整性。取总RNA 4.5 μg, 用AMV第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA。mdr1引物上游序列为5'-tgactaccaggctcgccaatgat-3', 下游为5'-tgtgccacc aagtaggctccaaa-3', 扩增片段跨越3个内含子, 产

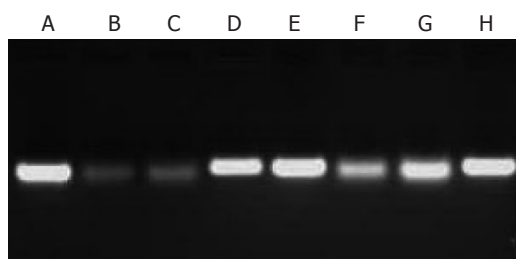


图 1 mdr1si326、mdr1si1513琼脂糖凝胶电泳. A, D: 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L mdr1si326; B: 1.5  $\mu$ L mdr1si326; C: 2.0  $\mu$ L mdr1si326; E, H: mdr1si1513模板; F: 1.5  $\mu$ L mdr1si1513; G: 2.0  $\mu$ L mdr1si1513.

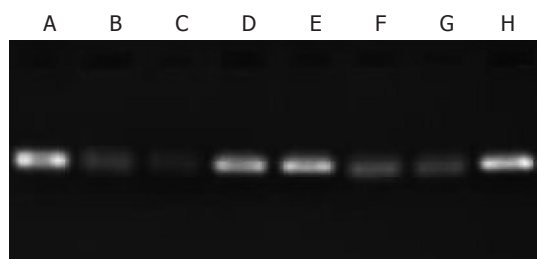


图 2 mdr1si2631、mdr1si3071琼脂糖凝胶电泳. A, D: 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L mdr1si326; B: 1.5  $\mu$ L mdr1si2631; C: 1.0  $\mu$ L mdr1si2631; E, H: mdr1si1513模板; F: 1.5  $\mu$ L mdr1si3071; G: 1.0  $\mu$ L mdr1si3071.

**创新盘点**  
本研究利用RNAi技术, 探讨靶向不同位点的siRNAs对胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02作用效果的趋势。

物457 bp;  $\beta$ -actin引物上游序列为5'-tcctgtggcatc cagcaact-3', 下游为5'-gaagcatttgccgtggacgat-3', 产物314 bp<sup>[3]</sup>. 取5  $\mu$ L cDNA, 用PCR扩增试剂盒进行PCR, 目的和内参片段同管扩增. 以pUC19 DNA/Msp I 作参照, PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 以mdr1和 $\beta$ -actin的比值进行mdr1基因mRNA表达水平的半定量分析. (3)免疫组织化学: 收取转染96 h后的SGC7901/VCR和K562/A02细胞, 细胞涂片, 采用SABC法检测P-gp的表达, 以PBS代替兔抗人P-gp多克隆抗体作阴性对照, 用已知P-gp阳性表达的结肠癌组织作阳性对照, 步骤严格按说明书进行. P-gp免疫组织化学阳性位于细胞膜, 呈棕黄色. 用彩色病理图文分析系统, 对结果进行定量分析. (4)FCM检测细胞内ADR蓄积: 转染72 h后的SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞换用含10 mg/L ADR的RPMI 1640培养液, 作用90 min, 收取细胞行流式细胞仪检测, 激发波长为488 nm, 接受波长为575 nm; 同时设PBS取代ADR的同种细胞为空白对照. 每次检测细胞 $(1-2) \times 10^5$ 个. 用ADR特异荧光阳性强度和特异荧光阳性率代表细胞内ADR蓄积量. (5)MTT法检测细胞对化疗药的敏感性: SGC7901/VCR细胞于转染48 h后收获, 并调节细胞密度至 $5 \times 10^8$ /L, 加200  $\mu$ L/孔入96孔培养板培养24 h后, 加入终浓度分别为1.65、3.3、33、330、660 mg/L的ADR<sup>[3]</sup>, 继续培养48 h, 按常规方法依次加入MTT和二甲基亚砜, 用酶标仪测定各孔的吸光度 $A_{570}$ . K562/A02细胞于转染72 h后收获, 调节细胞密度至 $5 \times 10^8$ /L, 加90  $\mu$ L/孔入于96孔培养板, 同时加入浓度为0.01、0.1、1、10和100 mg/L的ADR<sup>[2]</sup>, 培养48 h, 按改良MTT方法<sup>[4]</sup>依次加入MTT、三联液(10% SDS, 5%异丁醇, 0.012 mol/L HCL)100  $\mu$ L/孔, 于37℃放置过夜, 用酶标仪测定各孔的吸光度 $A_{570}$ . 每种药物浓度接种3个复孔, 设立只加PBS的细胞对照

和无细胞的试剂对照. 用对照组和药物组 $A_{570}$ 分别减去试剂组 $A_{570}$ , 得出校正对照组和药物组 $A_{570}$ , 计算存活率(校正药物组 $A_{570}$ /校正对照组 $A_{570}$ ). 用Origin 7.0软件, 绘制剂量生存曲线, 求出肿瘤细胞对ADR的半数抑制浓度( $IC_{50}$ ), 计算相对逆转率. 相对逆转率 =  $(IC_{50}A - IC_{50}B) / (IC_{50}A - IC_{50}C) \times 100\%$ , 其中 $IC_{50}A$ 为空白对照组耐药细胞,  $IC_{50}B$ 为转染siRNA组耐药细胞,  $IC_{50}C$ 为亲本细胞.

**统计学处理** 应用SPSS12.0统计软件进行统计学处理, 计量数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 两样本均数的比较用 $t$ 检验, 多样本均数的比较采用方差分析, 方差不齐时进行变量转换. 计数资料计算阳性率, 阳性率的比较用 $\chi^2$ 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

**2.1 体外转录合成siRNA** 以合成siRNAs的DNA模板为参照, 用2.5%琼脂糖凝胶进行合成siRNAs电泳的结果显示, 尽管合成的siRNAs相对分子质量较DNA模板小使泳动速度快, 但同分子量RNA在琼脂糖凝胶的电泳速度慢于DNA, 而使合成的siRNAs和DNA模板的距离拉开不大; 合成siRNAs的大小与设计相符, 浓度有别(图1-2).

**2.2 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞mdr1 mRNA表达的影响** siRNAs转染48 h后, SGC7901/VCR细胞mdr1 mRNA表达水平在mdr1si2631组的下降最明显, mdr1si326组次之( $P < 0.05$ ), mdr1si1513组和mdr1si3071组下降最少( $P < 0.05$ ); mdr1si1513组和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ ). siRNAs转染48 h后, K562/A02细胞mdr1 mRNA表达水平在mdr1si326组下降最明显, mdr1si1513组其次, mdr1si3071组下降最少; 4组之间的差别有统计



## 应用要点

本研究显示,靶向不同位点的siRNAs对两种耐药细胞作用效果趋势相似,为靶点的选择提供理论资料,也为siRNA药物研发提供依据。

表 1 4条siRNAs对SGC7901/VCR和K562/A02细胞mdr1 mRNA和P-gp表达以及对ADR蓄积的影响

分组	灰度比值(mean ± SD)		积分吸光度(mean ± SD)		阳性率(%)	
	SGC7901/VCR	K562/A02	SGC7901/VCR	K562/A02	SGC7901/VCR	K562/A02
空白对照	1.27 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.03 <sup>a</sup>	150.19 ± 22.89 <sup>a</sup>	34.82 ± 11.31 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	23.47 <sup>a</sup>
转染试剂	1.23 ± 0.04	1.55 ± 0.01	138.87 ± 68.76	38.27 ± 9.21	0.16	27.15
mdr1si326	1.06 ± 0.02	1.07 ± 0.02	45.76 ± 9.31	8.06 ± 4.76	0.25	35.17
mdr1si1513	1.18 ± 0.08	1.28 ± 0.02	99.26 ± 24.23	17.41 ± 2.86	0.16	29.20
mdr1si2631	0.86 ± 0.03	1.37 ± 0.03	70.50 ± 6.11	17.01 ± 3.17	1.40	34.26
mdr1si3071	1.17 ± 0.06	1.50 ± 0.03	65.81 ± 5.73	23.40 ± 4.86	0.32	28.95
亲本					7.65 <sup>a</sup>	36.90 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 各siRNA实验组。

表 2 4条siRNAs转染72 h后SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞对ADR的敏感性

分组	SGC7901/VCR		K562/A02	
	IC <sub>50</sub> (mean ± SD)	相对逆转率(%)	IC <sub>50</sub> (mean ± SD)	相对逆转率(%)
空白对照	344.21 ± 54.82 <sup>a</sup>		8.38 ± 1.86 <sup>a</sup>	
转染试剂	345.54 ± 37.94		7.50 ± 2.39	
mdr1si326	92.95 ± 9.58	74.09	0.85 ± 0.06	90.61
mdr1si1513	66.15 ± 4.08	81.99	3.87 ± 0.88	54.27
mdr1si2631	217.69 ± 48.38	37.31	0.37 ± 0.12	96.39
mdr1si3071	133.65 ± 42.50	62.09	1.29 ± 0.18	85.32
亲本	5.09 ± 3.14		0.07 ± 0.02	

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs siRNA实验组。

学意义( $P < 0.05$ , 表1)。

2.3 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞P-gp表达的影响 siRNAs转染96 h后, SGC7901/VCR细胞的P-gp表达水平在mdr1si326组下降最明显, mdr1si2631组和mdr1si3071组次之( $P < 0.05$ ), mdr1si1513组下降最少( $P < 0.05$ ); mdr1si2631组和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。siRNAs转染96 h后, K562/A02细胞的P-gp表达水平在mdr1si326组的下降最明显, mdr1si1513和mdr1si2631组次之( $P < 0.05$ ), mdr1si3071组下降最少( $P < 0.05$ ); mdr1si1513和mdr1si2631组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

2.4 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞内ADR蓄积的影响 siRNAs转染72 h后, SGC7901/VCR细胞内ADR特异荧光阳性率在mdr1si2631组最高, mdr1si326组和mdr1si3071组次之( $P < 0.05$ ); mdr1si326组和mdr1si3071组两组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。siRNAs转染72 h后, K562/A02细胞内ADR特异荧光阳性率在mdr1si326组最高, mdr1si2631组次之( $P < 0.05$ ),

mdr1si1513和mdr1si3071组最小( $P < 0.05$ ); mdr1si1513和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

2.5 4条siRNAs对SGC7901/VCR细胞和K562/A02细胞对ADR敏感性的影响 siRNAs转染72 h后, SGC7901/VCR细胞对ADR的IC<sub>50</sub>在mdr1si1513组的变动最大, mdr1si326组和mdr1si3071组次之, mdr1si2631组变动最小; mdr1si326组和mdr1si3071组之间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 其他组之间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。siRNAs转染72 h后, K562/A02细胞对ADR的IC<sub>50</sub>在mdr1si1513组变动最小, mdr1si326组、mdr1si2631组和mdr1si3071组减少显著( $P < 0.05$ ); mdr1si326组、mdr1si2631组和mdr1si3071组之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ ), 与亲本之间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ , 表2)。综合mdr1 mRNA和P-gp表达, P-gp功能以及对ADR耐药逆转程度4方面结果: 对人胃癌细胞SGC7901/VCR mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513; 对人红白血病细胞

K562/A02 mdr1介导的MDR逆转效果由高到低依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513。

### 3 讨论

2001年Elbashir *et al*<sup>[5]</sup>首次报道siRNA在多种哺乳动物体细胞系内成功抑制特异基因表达后, RNAi能否用于人类疾病治疗引起研究者兴趣。近年来, 国内外大量研究表明siRNA的作用效果与靶位点密切相关, 靶向不同靶位点的siRNA作用效果不同。许可慰 *et al*<sup>[6]</sup>用3条siRNAs靶向沉默人膀胱癌细胞株T24的*bcl-2*基因, 研究发现, 其中pGenesil-12042的抑制效果最好。潘修成 *et al*<sup>[7]</sup>针对HBV C基因序列设计5个siRNA靶位, 其中, 以SEC-492i的RNAi效率最高而SEC-282i相对较差。赵刚 *et al*<sup>[8]</sup>合成靶向幽门螺杆菌(*H. pylori*)*vacA*基因的5对siRNAs, 结果*vacA*-s2和*vacA*-s4的抑制作用最大。王春光 *et al*<sup>[9]</sup>用载体介导的3条siRNAs转染Lewis肺癌细胞, 结果Psilencer2•1-U6-siRNA-stat3-2对Lewis肺癌细胞中STAT3基因表达的抑制作用最强。在siRNA逆转mdr1介导的MDR的研究中, Pichler *et al*<sup>[10]</sup>证明针对8个靶位点所设计的siRNAs中, 只有第1条和第7条对降低mdr1 mRNA和P-gp表达水平以及逆转MDR表型有效。在高福莲 *et al*<sup>[11]</sup>的实验中, 针对胃癌SGC7901/VCR细胞mdr1 4段靶位点所设计的4条siRNAs中, mdr1si326的逆转效果最好, 并且研究提示: 在siRNA靶序列设计和选择中, 除了遵守Tuschl *et al*的设计原则外, 还应考虑靶序列的位置、靶序列结构、siRNA的正义链5'和3'末端碱基的种类, 尤其是靶序列结构, 尽可能选择自身无成茎和成环现象、靶序列和靶序列外碱基配对和氢键的数量最少的部位。赵澎 *et al*<sup>[11]</sup>针对神经胶质瘤耐药细胞系BT325的mdr1基因所设计的3条短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)中MDR1A和MDR1B对MDR的逆转作用较强; Chen *et al*<sup>[12]</sup>在肝癌细胞HepG2/ADM中转染的2条shRNA中, pGenSil-1/MDRB抑制了P-gp的表达, 而pGenSil-1/MDRA却不起作用; 在Gan *et al*<sup>[13]</sup>的实验中2条shRNAs均能降低乳腺癌耐药细胞MCF7/AdrR mdr1 mRNA和P-gp表达水平并逆转MDR表型, 2条shRNA对MDR表型效果明显不同, 但对降低mdr1 mRNA和P-gp表达水平的效果却无显著差异。Klosek *et al*<sup>[14]</sup>研究显示: 靶向Stat3不同位点的10条siRNAs, 对Stat3表达抑制效果不

同, 10 nmol/L的siRNAs对Stat3表达抑制范围为21%-67%, 1 nmol/L的siRNAs对Stat3表达抑制范围为13%-73%。对于靶向同一基因不同靶位点的siRNA作用效果不同的现象, Luo *et al*<sup>[15]</sup>试图通过试验证明这种“位点效应”是否主要与靶位点mRNA的二级结构有关。对此他们提出了“氢键指数(H-bond index)”-在靶位点和mRNA其他位点之间形成的平均氢键数, 并应用计算机方法, 检测Bcl-2, hTF, 和cyclin B1这3种基因的氢键指数, 发现氢键指数与siRNA的效果呈反比, 证明了“位点效应”主要与靶位点mRNA的二级结构有关, 并建议在将来siRNA的设计中参考氢键指数。本实验选定<sup>[3]</sup>并合成了4条siRNAs, 转染后SGC7901/VCR和K562/A02细胞的mdr1 mRNA和P-gp的表达水平降低, 细胞内ADR蓄积增加, 细胞对ADR的敏感性增加, 提示4条siRNAs均能逆转SGC7901/VCR和K562/A02细胞的MDR。本研究显示, 在SGC7901/VCR和K562/A02R细胞中, 4条siRNAs的作用效果均不同, 并且都是mdr1si326的逆转效果最强, mdr1si1513的作用最差。这进一步验证了siRNA的作用效果的“位点效应”。

靶向同一靶序列的siRNA在不同细胞中作用效果不同, siRNA的作用效果与细胞种类密切相关。张汝钢 *et al*<sup>[16]</sup>研究人端粒酶逆转录酶(hTERT)RNAi对2种肝癌细胞HepG2、SMMC-7221的影响, 将载体介导的siRNA转染2种细胞, 在2种细胞中的抑制效果不同: 2种细胞的老化率分别由0、3.6%增加到20.4%、10.0%, 凋亡率分别由3.5%、4.8%增加到5.2%、7.9%。孙延霞<sup>[17]</sup>用RNAi沉默胃癌细胞SGC7901的Survivin基因, 所用的Survivin2(166-185)和汤建光 *et al*<sup>[18]</sup>所用的pBSHH1-S(166-184)靶位点仅有1个碱基之差, 抑制效果却不相同: Survivin2和pBSHH1-S对Survivin mRNA表达的抑制率分别为69.24%和74%, 对Survivin蛋白表达的抑制率分别为58.17%和82%。在siRNA逆转MDR的大量实验中, 高福莲<sup>[3]</sup>用的4条siRNAs之一mdr1si326相同于Peng *et al*<sup>[2]</sup>用的3条序列之一si-mdr1-1, 高福莲研究显示此条siRNA转染后, SGC7901/VCR细胞mRNA表达水平、细胞内ADR积累和ADR耐药逆转3方面的数据变动和转染前比较有统计学意义, Peng *et al*研究显示此条siRNA转染后, K562/A02细胞mRNA表达水平、细胞内DAM积累和ADR耐药性逆转3方面的数据变动和转染前比较无统计学意义; Nieth

**名词解释**  
小分子干扰RNA(siRNA): 是一种小RNA分子(21-23核苷酸), 由Dicer(RNAase家族中对双链RNA具有特异性的酶)加工而成。siRNA是siRISC的主要成员, 激发与之互补的目标mRNA的沉默。

**同行评价**  
本研究紧随目前  
肿瘤药物治疗的  
前沿理念,讨论了  
靶向治疗中的关  
键问题,对于深入  
研究靶向治疗有  
很好的借鉴意义。

*et al*<sup>[19]</sup>实验显示相同的mdr1 siRNA同时转染胰腺癌细胞(EPP85-181RDB)和胃癌细胞(EPG85-257RDB)时,2种细胞对柔红霉素的耐药性分别降低89%和58%;Chen *et al*<sup>[12]</sup>实验中所选用的pGenSil-1/MDR-A与Yagüe *et al*<sup>[20]</sup>逆转白血病耐药细胞KD30 MDR实验中所2条shRNAs中的1条相同,在Yagüe *et al*的实验中此条shRNA的RNAi作用显著,在Chen *et al*<sup>[12]</sup>的实验中对肝癌细胞HepG2/ADM却不起作用。本实验以靶向mdr1不同靶位点的4条siRNAs,分别转染胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02。本研究显示,转染mdr1si2631 72 h后,SGC7901/VCR细胞内ADR荧光阳性率由0.13%增加至1.40%,耐药相对逆转率达37.31%;K562/A02细胞内ADR荧光阳性率由23.47%增加至34.26%,耐药相对逆转率达96.39%。本研究进一步验证了siRNA的作用效果与细胞种类有关。

孙延霞<sup>[17]</sup>用载体介导的siRNA-Survivin1和siRNA-Survivin2沉默Survivin基因在人胃癌细胞SGC7901和人白血病细胞K562的表达,结果siRNA-Survivin1具有抑制人胃癌细胞SGC7901增殖活性的作用,siRNA-Survivin2对细胞的抑制作用较弱;在siRNA-Survivin-1作用下,Survivin蛋白表达明显减少(Survivin/ $\beta$ -actin灰度比为0.21),抑制率为78.25%,在siRNA-Survivin-2作用下,Survivin蛋白表达也有所减少(Survivin/ $\beta$ -actin灰度比为0.58),抑制率为42%。总体来讲,在人胃癌细胞SGC7901和人白血病细胞K562中均是siRNA-Survivin1的抑制作用较强。Xu *et al*<sup>[21]</sup>以scAAV vector(Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus Vector)介导的2条siRNAs AAV-siMDR28mer和AAV-siMDR25mer转染人乳腺癌细胞NCI/ADR-RES和口腔癌细胞KB-C1,均能降低2种细胞P-gp表达,并逆转耐药表型,同研究表明scAAV vector介导的siRNA的抑制作用具有剂量和时间依赖性,但是未研究2条siRNAs的抑制作用是否有差别。Lu *et al*<sup>[22]</sup>为了研究前列腺肿瘤诱导基因1(prostate tumor-inducing gene 1, PTI-1)在人类前列腺癌中的作用,构建了载体介导的3条siRNAs pSlencer3.1-neo-Yu Lei[YL]1-2, -YL3-4 and -YL5-6,分别转染人前列腺癌细胞DU145和PC3,研究表明,仅siRNA pSlencer3.1-neo-YL1-2可以几乎完全抑制PTI-1在两种细胞中的表达,并可以阻止2种前列腺癌细胞的生长,而且在2种细胞的作用效果相似。

靶向同一基因不同靶位点的siRNA在不同细胞中作用效果的趋势如何尚未见报道。本实验针对高福莲 *et al*<sup>[1]</sup>和Peng *et al*<sup>[2]</sup>的研究,为探讨靶向mdr1不同靶位点的siRNAs对不同细胞作用效果的趋势如何,设计靶向mdr1 mRNA不同靶位点的4条siRNAs,分别转染胃癌耐药细胞SGC7901/VCR和人红白血病耐药细胞K562/A02,用RT-PCR检测mdr1 mRNA的表达、免疫组织化学检测mdr1蛋白水平的表达、流式细胞仪检测细胞内化疗药物的蓄积量、MTT法检测细胞对ADR的敏感性。综合mdr1 mRNA、P-gp表达以及P-gp功能和对ADR耐药逆转程度4方面结果显示,对SGC7901/VCR细胞mdr1介导MDR逆转效果由高到低的siRNAs依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513,这与高福莲<sup>[3]</sup>的实验结果相一致;对K562/A02细胞mdr1介导MDR逆转效果由高到低的siRNAs依次为mdr1si326、mdr1si2631、mdr1si3071和mdr1si1513。针对同一基因不同靶位点的4条siRNAs在2种肿瘤耐药细胞SGC7901/VCR和K562/A02中作用效果的趋势相似。

#### 4 参考文献

- 1 高福莲, 朱晓燕, 王峰, 吴景兰, 张钦宪. siRNA对SGC7901/VCR细胞mdr1基因沉默效果的影响因素分析. 肿瘤防治研究 2006; 33: 151-155
- 2 Peng Z, Xiao ZJ, Wang Y, Liu P, Cai YL, Feng WL, Han ZC. [Reversal of multi-drug resistance in K562/A02 cells by small interference RNA of mdr1 gene] *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2004; 25: 5-7
- 3 高福莲. siRNA逆转人胃癌细胞mdr1介导的多药耐药. 郑州: 郑州大学, 2006: 5-6
- 4 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 杨蔚怡. 评价抗癌物质活性的改良MTT方法. 中国医药工业杂志 1993; 24: 455-457
- 5 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 6 许可慰, 黄健, 林天歆, 郭正辉, 胡明, 尹心宝, 潘秋辉. RNAi技术沉默Bcl-2基因对人膀胱癌细胞株T24增殖影响的研究. 中华泌尿外科杂志 2007; 28: 26-29
- 7 潘修成, 陈智, 倪勤, 羊正纲, 徐宁, 金晗英. tRNA-(val)-shRNA表达框在筛选HBV C基因小干扰RNA靶位中的应用. 浙江大学学报(医学版) 2006; 35: 154-160
- 8 赵刚, 詹文华, 严燕国, 马晋平, 彭俊生, 董文广, 蔡世荣, 何裕隆. 靶向siRNA抑制幽门螺杆菌vacA表达. 世界华人消化杂志 2006; 14: 470-475
- 9 王春光, 孙梅, 王荣有, 赵雪俭, 张兴义. RNAi沉默STAT3基因表达对Lewis肺癌细胞生长影响的实验研究. 中国老年学杂志 2006; 26: 210-213
- 10 Pichler A, Zelcer N, Prior JL, Kuil AJ, Piwnicka-Worms D. In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4487-4494
- 11 赵澎, 胡微, 张亚卓, 孙梅珍, 何乐. RNA干扰技术逆转神经胶质瘤细胞多药耐药性. 中华肿瘤杂志 2006; 28:



- 183-187
- 12 Chen XP, Wang Q, Guan J, Huang ZY, Zhang WG, Zhang BX. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3332-3337
- 13 Gan HZ, Zhang GZ, Zhao JS, Zhang FC, Bu LS, Yang SJ, Piao SL, Du ZW, Gao S, Zheng DM. Reversal of MDR1 gene-dependent multidrug resistance using short hairpin RNA expression vectors. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 893-902
- 14 Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, Goda H, Hamakawa H. Stat3 as a molecular target in RNA interference-based treatment of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 20: 873-878
- 15 Luo KQ, Chang DC. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 303-310
- 16 张汝钢, 房殿春, 罗元辉, 郭丽萍. 人端粒酶逆转录酶干扰对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导肝癌细胞凋亡的影响. *中华肝病杂志* 2006; 14: 435-440
- 17 孙延霞. RNAi沉默survivin基因对胃癌及白血病细胞生长的抑制作用. 长春: 吉林大学, 2006: 31
- 18 汤建光, 唐北沙, 谭利明, 张玉虎, 曹立, 江泓. 质粒介导的RNAi对神经母细胞瘤细胞Survivin基因表达的抑制作用. *中国医师杂志* 2005; 17: 748-750
- 19 Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 2003; 545: 144-150
- 20 Yagüe E, Higgins CF, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther* 2004; 11: 1170-1174
- 21 Xu D, McCarty D, Fernandes A, Fisher M, Samulski RJ, Juliano RL. Delivery of MDR1 small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Ther* 2005; 11: 523-530
- 22 Lu PY, Xie FY, Woodle MC. siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5: 225-234

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 汤姆森-路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-11-28)