

介导 MDR1 的 RNAi 腺病毒载体的构建

张志云^{1,2}, 郑启昌¹, 戴宗晴², 张有顺², 邹 灿², 黄 玲², 王 菊²

Construction and Application of Recombinant Adenovirus Vector Expressing the MDR1 shRNA

ZHANG Zhi-yun^{1,2}, ZHENG Qi-chang¹, DAI Zong-qing², ZHANG You-shun², ZOU Can², HUANG Ling², WANG Ju²

1. Department of Hepatobiliary surgery, Union Hospital Affiliated Tongji medical College of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China; 2. Institute of Hepatobiliary Surgery, DongFeng General Hospital Affiliated Yunyang Medical University

Abstract: **Objective** To construct a recombinant adenovirus vector expressing the MDR1 shRNA and investigate its effect in human hepatocellular carcinoma cell. **Methods** According to the MDR1 mRNA sequence, the DNA segment homogenizing with MDR1 shRNA was synthesized and cloned into the shuttle plasmid pshuttle-MDR1. The later and adenovirus vector were cotransfected to package the pAd-MDR1. pAd-MDR1 was transfected into human hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721. The expression of P-gp on the cellular membrane was detected by FCM and western blot. Rhodamine123 (Rh123) retention in SMMC-7721 cell was detected by confocal microscopy. **Results** The pshuttle-MDR1 plasmid was identified with the method of PCR. After transfecting SMMC-7721 cell with pAd-MDR1, FCM detected that the positive rate of P-gp expression (22.9% and 30.8%) was far lower than control (85.8%), and in SMMC-7721/R cell, western blot detected that the quantity of P-gp was lower than control, just like the quantity in SMMC-7721/S cell. **Conclusion** The pshuttle-MDR1 adenovirus vector is prepared successfully and its inhibition of MDR1 in SMMC-7721 cell is confirmed.

Key words: RNA interference; Hepatocellular carcinoma cell; MDR1; Adenovirus vector

摘要: **目的** 介导 MDR1 的 RNAi 腺病毒载体, 探讨 RNA 干扰 MDR1 基因对人肝癌细胞的作用。 **方法** 根据 MDR1 mRNA 序列构建表达 MDR1 mRNA 特异的 shRNA 的腺病毒穿梭质粒 pshuttle-MDR1。与腺病毒载体体内重组为 pAd-MDR1 后转染人肝癌细胞 SMMC-7721, 以 FCM 检测细胞表面膜蛋白 P-gp 表达阳性率, 以共聚焦显微镜检测细胞内 Rh123 的滞留, Western Blot 检测 P-gp 蛋白量的变化。 **结果** 构建成 pshuttle-MDR1 经限制性酶切和 PCR 证实与设计一致, 将 pAd-MDR1 转染肝癌细胞 SMMC-7721 后, FCM 检测细胞表面膜蛋白 P-gp 表达阳性率为 22.9% 和 30.8%, 远低于对照组 (85.8%)。Western Blot 经病毒感染的 SMMC-7721/R 的 P-gp 含量明显低于对照 SMMC-7721/R, 而与 SMMC-7721/S 细胞接近。 **结论** 成功构建了 pshuttle-MDR1 腺病毒载体, 并有效干扰了肝癌细胞 SMMC-7721 MDR1 的表达。

关键词: RNAi; 肝癌细胞; 多药耐药基因; 腺病毒载体

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2006)11-0798-04

0 引言

化疗仍是肝癌综合治疗的重要手段之一, 但是肿瘤的多药耐药性成为化疗的障碍。其中 MDR1 基因及其产物的过度表达是多耐药的重要机制之一^[1]。我们应用 RNAi 技术可在细胞水平明显抑制肝癌细胞 SMMC-7721 和 Bel-7402 的 MDR1 的

表达^[2,3]。为了进一步提高对细胞的转染效率以及为后期的动物实验做准备。我们设计构建了介导对于 MDR1 的 RNAi 的腺病毒载体, 并进行了功能实验来验证设计思路的正确和载体构建的成功。

1 材料与方法

1.1 质粒 质粒 PGE-1、腺病毒载体 pAdeasy-1 及穿梭质粒 pshuttle 均购自 Stratagene 公司。将针对 MDR1 的三段 siRNA 序列重组到 PGE-1 质粒构建的 shRNA 质粒 pshMDR1₁、pshMDR1₂、pshMDR1₃ 均由本室设计并完成^[2,3]。将 pshMDR1 和 pshuttle 分别做 XhoI 和 XbaI 双酶切并纯化, 重组

收稿日期: 2006-03-21; 修回日期: 2006-09-13

基金项目: 湖北省教育厅资助项目 (2004D006)

作者单位: 1. 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科; 2. 鄖阳医学院附属东风总医院肝胆外科研究所

作者简介: 张志云 (1970-), 男, 硕士, 主要从事肝脏肿瘤基因治疗研究

构建成 pshuttle-MDR1。

1.2 细菌培养转化及重组质粒的筛选 大肠杆菌 SCS1、gold10 及 BJ5183 均购自 Stratagene 公司。常规氯化钙法转化细菌。pAdeasy-1 质粒由含氨基青霉素 LB 培养基筛选,其他均由含卡那霉素 LB 培养基筛选。

1.3 PCR 引物设计:选择 Pshuttle MCS 两侧设计 PCR 引物用作重组质粒的筛选,引物序列为: 5'-CGT CGA TTT TTG TGA TGC TCG TCA G-3' 和 5'-GAA GCA TTT ATC AGG GTT ATT GTC TCA TG-3' 由上海生工合成。PCR 反应条件: 94 3min;94 30s,55 30s,72 1min。琼脂糖凝胶电泳,未重组 Pshuttle 质粒为 160bp 左右产物,而重组质粒在 600bp 左右。

1.4 腺病毒载体的构建操作基本照公司操作手册进行,大致如下:重组质粒 pshuttle-MDR1 经 PmeI 限制性酶切,与腺病毒质粒 padeasy 共转化 BJ5183 菌株,鉴定后的阳性克隆经扩增、PacI 酶切后,在 AD-293 细胞中包装完整病毒颗粒。

1.5 细胞培养与转染 人耐药肝癌细胞株 SMMC-7721/R(耐 ADM 浓度 0.2μmol/L)由本室诱导^[4],常规培养于含 10%小牛血清,青、链霉素各 100U/ml RPMI 1640 培养基中。LyoVec™ 转染试剂为美国 Invivo Gen 公司脂质体产品,按说明书要求进行转染。转染空载体和无关序列载体作阴性对照,以表达荧光素酶基因的载体及 shluc 基因的表达质粒作为阳性对照组。

1.6 细胞表面膜蛋白 P-gp 表达检测 各组细胞经消化并调整细胞数为 1 × 10⁶/ml, 2% 甲醛固定,加入抗 P-gp 抗体(NeoMarkers 公司产品),4 孵育 2h;加 FITC-标记的羊抗鼠 IgG FITC-标记的羊抗鼠 IgG(美国 KPL 产品),室温避光孵育 30min,流式细胞仪(Beckman coulter: EPICX XL)检测细胞表面 P-gp 阳性率。试验重复 3 次。Western Blot 参照 Ernesto Yague 等^[5]的方法,将经培养细胞用 Ripa (Ripa lysis buffer) 溶细胞缓冲液(50mM Tris-HCl (pH 7.4) 150mM NaCl、5mMEGTA 1% Triton X-100 0.1% SDS) 溶解,高速离心取上清,与上样缓冲液 1:1 混合,经 10% 电泳分离,电转移到硝酸纤维薄膜,5% 奶粉封闭非特异性位点后,与 1:50 抗 P-gp 抗体温育 2h,充分洗涤后与 1:50 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(华美生物工程公司产品)温育 2h, DAB 显色

1.7 细胞内 Rh123 的滞留检测 调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml,加入 Rh123 (0.2mg/L) 37 培养箱共孵育 45min,冷 PBS 洗 2 遍,在 0.5h 内用流式细胞仪

检测细胞内 Rh123 的强度或者用共聚焦显微镜检测。相同处理组平行 5 孔,以未经处理的 Bel-7402/R 细胞为空白对照。

2 结果

2.1 表达针对 MDR1 的 shRNA 和 pshuttle 的设计及构建

pshRNA-MDR1 重组表达质粒的构建过程以及体内从 DNA 模板产生 shRNA 的策略,见图 1。我们前期构建的 pshMDR1₁₋₃是在 PGE-1 质粒上插入与 MDR1 同源的 shRNA₁₋₃序列构建而成^[2,3]。MDR1shRNA₁₋₃的同源序列分别为 5'-GGA GGC-CAACA TACA TGCCTT-3'、5'-GA TCGCTACT-GAA GCAA TA GA-3'、5'-GGA GGCCAACA TA-CA TGCCTTCA TCGA GT-3'。通过对 PGE-1 的酶切位点分析发现在 PGE-1 的起点有一个 XhoI 酶切位点,因此用 XhoI 和 XbaI 双酶切可以得到包括 U6 启动子和 shRNA 序列的完整 shRNA 表达单元,大小为 440bp,并且在 pshuttle 的 MCS 上包含此酶切位点,见图 1。对 PGE-1 和 pshMDR1 的酶切分析表明该质粒不含 Pme I 和 Pac I 酶切位点。说明该质粒片段可以用来构建腺病毒表示载体。将带 U6 启动子的上述质粒扩增及提取后经电泳、回收和与经同样双酶切 pshuttle 进行连接得到新的重组质粒,分别命名为 pshuttle-MDR1₁、pshuttle-MDR1₂、pshuttle-MDR1₃。用 PCR 鉴定结果显示在相对分子质量 600bp 左右处有一条明亮的条带,符合阳性克隆的特性,见图 2。将其转染到 SMMC-7721/R 细胞内明显的抑制 MDR1 功能的表达,实验结果证明了我们设计的正确性。

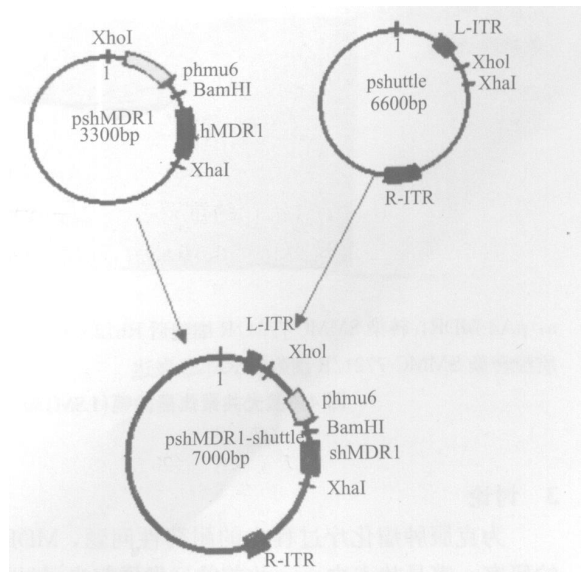


图 1 pshuttle-MDR1 重组质粒的设计和构建过程

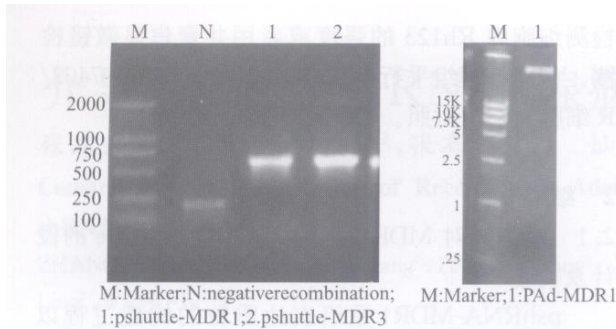


图 2 pshuttle-MDR1 质粒 PCR 结果 图 3 PA α -MDR1 酶切结果

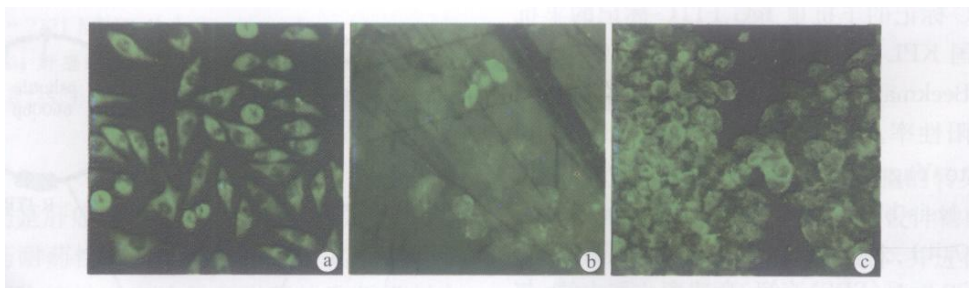
2.2 病毒载体的构建及颗粒的包装

将构建的 pshuttle-MDR1 经 PmeI 酶切成线形质粒,再进行去磷酸化以防止其自身环化,与腺病毒骨架质粒 PAdeasy 共同转化含重组酶的 BJ5183 菌株内完成重组。用卡那霉素条件培养基筛选出含有目的片段的重组腺病毒质粒。而骨架质粒 PAdeasy 因为是氨苄抗性而不能生长。目前我们已构建了表达 shRNA1 和 shRNA3 的腺病毒质粒,分别命名为 PA α -MDR1₁ 和 PA α -MDR1₃。构建产物的正确性由以下两个实验说明:(1)将该质粒经 PacI 酶切电泳后产生了 2 条片段,一条为 30 Kd 左右,另一条位于 2.5~5 Kd 之间,符合试剂合说明书要求,见图 3;(2)将该质粒 PacI 酶切产物加入到 AD293 细胞培养后,提取细胞裂解产物进行 PCR,可以得到与 pshRNA-MDR1 质粒进行 PCR 的相同结果,见图 2。

2.3 PA α -MDR1 对的抑制作用

将的病毒加入到细胞中,培养一周后进行下述实验证明对 MDR1 表达的抑制作用。

2.3.1 罗丹明滞留试验



a: p α -MDR1₁ 转染 SMMC-7721/R 细胞后 Rh123 表达;b: 未转染质粒 SMMC-7721/R 细胞 Rh123 荧光表达;c: p α -MDR1₃ 质粒转染 SMMC-7721/R 细胞后 Rh123 表达

图 4 激光共聚焦显微镜(LSM)观察载体转染 SMMC-7721/R 细胞后 Rh123 表达

3 讨论

为克服肿瘤化疗过程中的耐药性问题,MDR1 的研究一直是热点之一。此前曾经发展起来了针对

罗丹明 123 在细胞内的滞留反映了 MDR1 的产物 P-gp 的功能。罗丹明 123 与细胞共培养后经流式细胞仪检测结果提示,PA α -MDR1₁ 和 PA α -MDR1₃ 转染的细胞平均荧光强度显著高于 SMMC-7721/R 细胞系细胞,阳性率分别为 91.5%、90.8%,后者阳性率为 29.7%,见表 1。共聚焦结果也显示了彼此之间的差异,见图 4。

2.3.2 P-gp 表达的检测

用间接免疫荧光法检测细胞膜表面 P-gp,经流式细胞仪检测可见各组细胞的阳性率分别是:SMMC-7721/S,26.3%;SMMC-7721/R,85.3%;SMMC-7721/R + PA α -MDR1₁,22.9%;SMMC-7721/R + PA α -MDR1₃,30.8%;SMMC-7721/R + PGE-1,85.8%(图略)。Western Blot 结果也表明:2 μ g 相同蛋白量的样品中,经病毒感染的 SMMC-7721/R 在 170 Kd 处的显色明显低于对照 SMMC-7721/R,而与 SMMC-7721/S 细胞接近,见图 5。

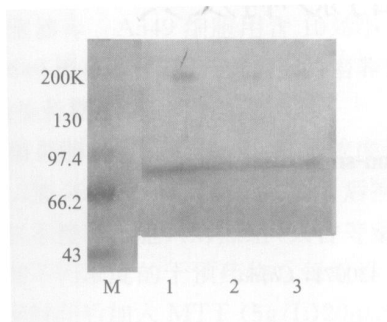
表 1 细胞内 Rh123 的积累量(\bar{x})

Cells	n	Average fluorescence intensity	Positive ratio (%)
SMMC-7721/S	3	82.1	97.2
SMMC-7721/R	3	32.8	29.7
SMMC-7721/R + PA α -MDR1 ₁	3	79.3	91.5 ^a
SMMC-7721/R + PA α -MDR1 ₃	3	72.4 ^a	90.8 ^a
SMMC-7721/R + PGE-13	3	33.5	24.3

$P < 0.05$ VS SMMC-7721/R, SMMC-7721/R + PGE-1

MDR1 基因的反义核苷酸技术和针对 MDR1 产物的抗原抗体技术^[6]。由于 RNAi 技术在基因表达控制方面具有独特优势,本实验室和其他一些实验室纷纷开展了 RNAi 用于 MDR1 的研究,技术路线各

有差异,包括化学合成 siRNA、质粒介导的和病毒介导的体内表达 shRNA 等方法^[7-10]。



Western Blot 结果 M:Marker;1:SMMC-7721/R;2:SMMC-7721/R + PAα-MDR1;3:SMMC-7721/S。

图 5 PAα-MDR1 抑制 P-gp 表达

本实验室自 2002 年以来先期开展了 PGE-1 质粒介导的 shRNA 抑制肝癌细胞 MDR1 的研究并取得了一些成果。我们针对的 MDR1 不同位点设计了三段 shRNA 分别作用于耐药肝癌细胞 SMMC-7721/R 和 Bel-7402R,本文中我们又将其中两段 shRNA 构建到腺病毒载体上作用于 SMMC-7721/R,均取得了较好的抑制 MDR1 效果。应用腺病毒载体进行 RNAi 研究,我们认为有以下优势:(1)可以感染不同细胞类型。RNAi 的效果除了受 DNA 靶点影响外,细胞间的差异也是重要因素。Christiane Nieth 等^[11]用同样 siRNA 分别对胃癌细胞 EPC85-257RDB 和胰腺癌细胞 EPP85-181RDB 做 RNAi,结果虽然使 MDR1 mRNA 下降均在 90%左右,但对阿霉素的抵抗两者差别较大(89% vs 58%)。而 Stewart 等^[12,13]则指出:不同细胞处理 shRNA 的能力不同而导致 RNAi 的效果不同;(2)可以提高 siRNA 转入细胞效率;(3)即可以转染分裂细胞又可以转染静止细胞,还可以进行活体转染。相信将在后期的动物实验工作中发挥重要作用。

用。

参考文献:

[1] Grude P, Conti F, Mennecier D, et al. MDR1 gene expression in hepatocellular carcinoma and the peritumoral liver of patients with and without cirrhosis[J]. Cancer Letters, 2002, 186:107-113.

[2] 胡礼仪,周新,张有顺,等.载体介导的 RNA 干扰抑制肝癌耐药细胞 MDR1 表达的实验研究[J].肿瘤防治杂志,2004,11(11):1158.

[3] 秦伟超,张有顺,周新,等.抑制 MDR1 基因表达 shRNA RNAi 系统的构建[J].山东医药,2005,45(13):19-20.

[4] 王学军,戴宗晴,刘志芬,等.人肝癌多药耐药细胞株建立及 MDR1 稳定表达的研究[J].实用癌症杂志,2003,18(6):580.

[5] Ernesto Yague, Angel L. Armesilla, Georgina Harrison: P-glycoprotein (MDR1) Expression in Leukemic Cells Is Regulated at Two Distinct Steps, mRNA Stabilization and Translational Initiation THE J J]. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2003, 278(12): 10344-10352.

[6] Celius T, Garberg P, Lundgren B: Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(1):365-371.

[7] 王萍玲,胡丽娜,邓凯贤,等. RNA 干扰沉默 mdr1 基因联合阿霉素对卵巢癌耐药细胞株 SKOV-3/ADM 增殖的抑制作用[J].重庆医科大学学报,2005,30(02):18.

[8] 彭智,肖志坚,王一,等. siRNA 逆转 K562/A02 细胞多药耐药的研究[J].中华血液学杂志,2004,25:5-7.

[9] 李臣宾,张峰,史玉荣,等.小干扰 RNA 引发多药耐药乳腺癌细胞内 MDR1 基因沉默研究[J].中华实验外科杂志,2004,21(10):1199-1201.

[10] 胡海燕,张涓. siRNA 对肺癌细胞株 NCI-H460 bcl-2 基因表达的影响[J].暨南大学学报,2005,26:(02) 174-180.

[11] Nieth C, Priebisch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi) [J]. FEBS Lett, 2003, 545(2-3):144-150.

[12] Stewart SA et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells[J]. Rna, 2003, 9: 493-501.

[13] Yague E, Higgins CF, Raguz S: Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1[J]. Gene Ther, 2004, 11(14):1170-1174.

[编辑:刘红武]