

· 基础研究 ·

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.009

沉默 *MDR1* 基因表达逆转白血病耐药 HT9 细胞对大蒜素的耐药性

张伟伟, 邵淑丽, 张珍珠, 张宇, 付博 (齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的:** 利用短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 表达载体沉默耐药细胞 HT9 中 *MDR1* 基因表达, 从而逆转人早幼粒白血病细胞株 HT9 对大蒜素的耐药性。**方法:** 根据 *MDR1* 基因序列设计 shRNA 片段, 构建靶向 *MDR1* 基因的 pSilencer3.1-sh*MDR1* 表达载体, 稳定转染 HT9 细胞, real-time PCR 检测细胞中 *MDR1* mRNA 的表达, Western blotting 检测 HT9 细胞中 P-糖蛋白 (*MDR1* 基因编码) 的表达, MTT 法检测细胞存活率, 琼脂糖凝胶电泳检测经大蒜素处理后 HT9 细胞的凋亡, 电镜观察细胞超微结构变化, 流式细胞术检测细胞周期。**结果:** 成功构建靶向 *MDR1* 的表达载体 pSilencer3.1-sh*MDR1*, 稳定转染 HT9 细胞形成 HT9-sh*MDR1* 细胞系, HT9-sh*MDR1* 细胞中 *MDR1* mRNA 表达显著降低 [(0.027 ± 0.002) vs (0.110 ± 0.005), $P < 0.01$], P-糖蛋白表达也明显降低 [(0.856 ± 0.014) vs (1.454 ± 0.027), $P < 0.05$]。大蒜素对 HT9-sh*MDR1* 细胞的 IC_{50} 较对未转染组 HT9 细胞明显降低 [(26.66 ± 0.59) vs (52.75 ± 0.64) $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$], HT9-sh*MDR1* 细胞对大蒜素耐药的相对逆转率为 (49.45 ± 1.86)%。与未转染组 HT9 细胞相比, 经大蒜素处理后 HT9-sh*MDR1* 细胞凋亡的 DNA 片段更为明显, 电镜下可见细胞凋亡特有的半月体形成。大蒜素处理不影响未转染组 HT9 细胞和对照质粒转染后 HT9 细胞 (HT9-neo 细胞) 的细胞周期, 但大蒜素处理使 HT9-sh*MDR1* 细胞的 S 期细胞比例减少 [(31.40 ± 2.13)% vs (53.80 ± 1.87)% , $P < 0.01$], G_2/M 期细胞比例增多 [(35.62 ± 2.06)% vs (9.37 ± 2.09)% , $P < 0.01$]。**结论:** 靶向 *MDR1* 的干扰表达载体 pSilencer3.1-sh*MDR1* 能够抑制 *MDR1* 基因的表达, 从而逆转 HT9 细胞对大蒜素的耐药性。

[关键词] 白血病细胞; HT9 细胞; *MDR1* 基因; 短发夹 RNA; 多药耐药; 大蒜素

[中图分类号] R733.7; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0052-06

Silencing *MDR1* gene expression reverses resistance of drug-resistant leukemia HT9 cells to allicin

Zhang Weiwei, Shao Shuli, Zhang Zhenzhu, Zhang Yu, Fu Bo (College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of short hairpin RNA (shRNA) expression plasmid on silencing of *MDR1* gene in drug resistant H79 cells and thus reverse the drug resistance of human promyelocytic leukemia HT9 cells to allicin. **Methods:** shRNA fragment targeting *MDR1* gene was designed and constructed to obtain pSilencer3.1-sh*MDR1* expression plasmid, which was then stably transfected into HT9 cells. The expression of *MDR1* mRNA in HT9 cells was assayed by real-time PCR. The P-gp protein (encoded by the *MDR1* gene) expression was assayed by Western blotting. The cell mortality rate of HT9 cells was determined by MTT method. After treated with allicin, the apoptosis of HT9 cells was observed by gel electrophoresis, cell ultrastructure changes were observed under a transmission electron microscope, and the cell cycle was detected by flow cytometry. **Results:** pSilencer3.1-sh*MDR1* expression plasmid targeting *MDR1* was constructed successfully and then stably transfected into HT9 cells to form the HT9-sh*MDR1* cell line. The *MDR1* mRNA ([0.027 ± 0.002] vs [0.110 ± 0.005], $P < 0.01$) and P-gp protein expressions ([0.856 ± 0.014] vs [1.454 ±

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目 (No. C200624); 黑龙江省教育厅科学技术项目资助 (No. 11511447, No. 12511611); 齐齐哈尔大学青年教师科研启动基金资助项目 (No. 2011K-M38)。Project supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China (No. C200624), the Science and Technology Research Project of Heilongjiang Education Bureau (No. 11511447, No. 12511611), and the Start-up Scientific Research Foundation for Young Teachers in Qiqihar University (No. 2011K-M38)

[作者简介] 张伟伟 (1981 -), 女, 山东省苍山县人, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤生物学方面的研究。E-mail: zww121@163.com

[通信作者] 邵淑丽 (Shao Shuli, corresponding author), E-mail: shshl32@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130116.0826.006.html>

0.027], $P < 0.05$) were significantly decreased in HT9-shMDR1 cells. The IC_{50} of allicin to HT9-shMDR1 cells significantly decreased compared with that in untransfected HT9 cells ($[26.66 \pm 0.59]$ vs $[52.75 \pm 0.64]$ $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$). The relative drug resistance reversal rate of HT9-shMDR1 to allicin was $(49.45 \pm 1.86)\%$. Compared with untransfected HT9 cells, DNA ladder was more obvious in HT9-shMDR1 cells treated with allicin, and the typical apoptotic body was found by electron microscopy. Allicin treatment did not affect the cell cycle distribution of untransfected HT9 cells and control plasmid transfected HT9 cells (HT9-neo cells). However, the ratios of allicin-treated HT9-shMDR1 cells were significantly decreased in the S phase ($[31.40 \pm 2.13]\%$ vs $[53.80 \pm 1.87]\%$, $P < 0.01$) and were significantly increased in the G_2/M phase ($[35.62 \pm 2.06]\%$ vs $[9.37 \pm 2.09]\%$, $P < 0.01$). **Conclusion:** pSilencer3.1-MDR1 expression plasmid targeting *MDR1* gene can inhibit the expression of *MDR1* gene, therefore reversing drug resistance of HT9 cells to allicin.

[**Key words**] leukemia cell; HT9 cell; *MDR1* gene; short hairpin RNA; multidrug resistance; allicin

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 52-57]

白血病细胞对化疗药物产生多药耐药(multi-drug resistance, MDR)是临床上导致白血病治疗失败和复发的主要原因^[1]。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)由人类MDR基因家族中与耐药有关的*MDR1*基因编码,它在肿瘤细胞膜上形成一个近似烟卤状通道,可以利用ATP水解释放的能量将化疗药物泵出细胞外,使细胞内药物浓度始终维持在低水平,减弱药物的细胞毒作用,从而导致细胞对结构和作用机制不同的多种化疗药物产生耐药性^[2-4]。已报道多种抗癌药物,尤其是天然抗癌药物,包括长春新碱、蒽环类药物(柔红霉素、多柔比星)和紫杉醇等都是P-gp外排的作用底物^[5]。RNA干扰(RNA interference)作为一种新的特异性封闭目的基因表达的方法,已成功用于肿瘤的治疗和研究^[6-10]。为了稳定、持久地逆转白血病细胞的多药耐药性,本研究采用靶向*MDR1*的shRNA质粒载体pSilencer3.1-shMDR1转染白血病多药耐药HT9细胞,经G418筛选,有限稀释法挑取单克隆得到阳性单克隆细胞,用大蒜素(allicin)处理化疗敏感白血病细胞HL-60、耐药HT9细胞和转染后的HT9细胞,探讨pSilencer3.1-shMDR1阳性表达的HT9细胞在多药耐药逆转方面的变化。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

质粒pSilencer3.1-H1 neo购自北京鼎国生物公司,敏感的和耐三尖杉酯碱的人白血病细胞株HL-60、HT9来源于北京师范大学生命科学学院,RPMI 1640培养基、胎牛血清、凋亡细胞DNA提取试剂盒购自上海生工生物公司;C219一抗、内参 β -actin一抗购自Signet公司,二抗IgG购自Jakson

Immuno Research Lab公司。ECM830型电穿孔仪购自美国BTX公司,荧光定量RCP仪购自美国伯乐公司,流式细胞仪FC500购自美国贝克曼公司。

1.2 靶向*MDR1*基因的shRNA表达载体的构建

根据GenBank P-糖蛋白编码基因[ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1]*MDR1* mRNA的已知序列(NM_000927),选择shRNA特异性靶位点序列。设计合成*MDR1*基因编码shRNA的DNA模板,将其定向克隆到pSilencer3.1-H1 neo载体上,shRNA表达质粒命名为pSilencer3.1-shMDR1。连接产物转化感受态细菌,提取质粒,测序鉴定。以含随机对照序列的pSilencer3.1-H1 neo质粒(命名为pSilencer3.1-neo)作为阴性对照。

1.3 pSilencer3.1-shMDR1质粒转染HT9细胞

人白血病细胞用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、0.1 mg/ml链霉素的RPMI 1640培养液于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。为了维持HT9细胞株的耐药亚型,培养液中加入1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的三尖杉酯碱。实验前2周换用无三尖杉酯碱的培养液。取对数生长期的HT9细胞,通过pEGFP-N1质粒优化电转染条件,线性化的对照组质粒和重组质粒于最佳电转染条件下电转染HT9细胞,采用600 $\mu\text{g/ml}$ G418筛选建立稳定表达pSilencer3.1-shMDR1的HT9细胞克隆。有限稀释法挑取单克隆转染细胞分别得到稳定表达pSilencer3.1-shMDR1和pSilencer3.1-neo的HT9细胞(记作HT9-shMDR1和HT9-neo细胞)。

1.4 Real-time PCR检测*MDR1* mRNA的表达

采用UNIQ-10柱式TRIzol总RNA抽提试剂盒(Sangon)提取HT9、HT9-Neo和HT9-shMDR1细胞总RNA。*MDR1*上游引物:5'-ATATCAGCAGCCCA-CATCAT-3',*MDR1*下游引物:5'-GAAGCACTGGG

ATGTCGGT-3', 扩增产物为 154 bp。以 β -actin 为内参照, β -actin 上游引物: 5'-ATCATGTTTGGAGACCTTCAACA-3', β -actin 下游引物: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 扩增产物为 318 bp。Real-time PCR 扩增条件: 94 °C、3 min, 94 °C、1 min, 58 °C、1 min, 72 °C、1 min; 循环 35 次, 循环结束后进行溶解曲线检测。实验重复 3 次。MDR1 mRNA 的相对含量根据 $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ 计算。

1.5 Western blotting 检测细胞中 MDR1 蛋白表达

收集未转染、稳定转染 pSilencer3.1-neo 和 pSilencer3.1-shMDR1 重组质粒的 HT9 细胞, 提取总蛋白, 样品进行 SDS-PAGE, 用 Bio-Rad 电转仪将蛋白转移到 PVDF 膜上, 转膜条件为 150 V 恒压 3 h, 按照分子量大小剪取目的条带, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 然后加入 1 ml 鼠抗人单克隆 P-gp 一抗 C219 (1:100), 或者加入 1 ml 鼠抗人单克隆 β -actin 一抗, 4 °C 孵育过夜, PBS 洗膜 3 次, 每次 5 min, 分别加入 2 ml 羊抗兔二抗 IgG (1:10 000), 室温孵育 2 h, PBS 洗膜 3 次, 每次 5 min, ECL 发光液发光成像, 用凝胶图像分析软件分析灰度值。

1.6 MTT 法检测耐药细胞对大蒜素的敏感性

细胞中分别加入终质量浓度为 0、10、25、50、75、100、125、150 μ g/ml 的大蒜素, 常规 MTT 法检测 HT9 细胞的存活率, 570 nm 波长下测定光密度值 (D 值)。细胞存活率 (%) = $D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。计算大蒜素的半数抑制浓度 IC_{50} , 并计算相对耐药逆转率。逆转率 (%) = $(IC_{50}A - IC_{50}B)/(IC_{50}A - IC_{50}C) \times 100\%$, $IC_{50}A$ 、 $IC_{50}B$ 、 $IC_{50}C$ 分别代表转染前耐药 HT9 细胞、转染后 HT9 细胞和敏感 HL-60 细胞的 IC_{50} 值。实验结果重复 3 次。

1.7 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 HT9 细胞凋亡

各组细胞中分别加入终浓度为 30 μ g/ml 大蒜素作用 24 h 后, 按照凋亡细胞 DNA 提取试剂盒说明书提取各组细胞 DNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段化反映细胞凋亡。

1.8 透射电镜观察大蒜素对 HT9 细胞的影响

HT9 细胞中分别加入终质量浓度为 30 μ g/ml 的大蒜素作用 24 h 后, 离心收集细胞, 按常规方法固定、洗涤、脱水、石蜡包埋, 置 60 °C 烘箱内 48 h。LKB III 型超薄切片机切片, 柠檬酸铅染色液染色。透射电镜观察观察 HT9 细胞形态, 细胞质及细胞核的变化, 照像并记录实验结果。

1.9 流式细胞术检测 HT9 细胞周期

HT9 细胞中分别加入终质量浓度为 30 μ g/ml 的大蒜素作用 24 h 后, 离心收集细胞, 加入 1 ml

-20 °C 预冷的 70% 乙醇, 充分混匀, 4 °C 保存, 固定至少 18 h 后调整细胞密度至 1×10^6 /ml, 取 1 ml 细胞悬液, 用 PBS 洗 3 次, 细胞重悬于 1 ml 含 20 μ g/ml RNase A 和 50 μ g/ml PI 的染液中, 37 °C 孵育 30 min, 流式细胞术检测 HT9 细胞周期(汞激发波长为 488 nm)。

1.10 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计学软件, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 其中组间两两比较用 LSD 法检测, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 MDR1 基因 shRNA 表达载体

经测序结果鉴定, pSilencer3.1-shMDR1 重组质粒的碱基序列与预期结果一致, 靶向 MDR1 的重组干扰质粒构建成功。

2.2 pEGFP-N1 质粒优化电转染条件

电转染时间定为 30 ms, 分别调节电压梯度为 240、250、260、270、280、290 V 进行电转染。结果显示, 电压为 280 V 时, HT9 细胞存活率在 40% ~ 50%, 有约 80% 的细胞呈绿色荧光, 因此确定脉冲时间 30 ms、电压 280 V 为电转染 HT9 细胞的最佳条件。

2.3 pSilencer3.1-shMDR1 质粒转染抑制 HT9 细胞 MDR1 mRNA 的表达

转染重组质粒 pSilencer3.1-shMDR1 后, 稳定表达重组质粒的 HT9-shMDR1 细胞中 MDR1 mRNA 的表达水平由转染前的 (0.110 ± 0.005) 下调至转染后的 (0.027 ± 0.002), 组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 转染阴性对照 pSilencer3.1-neo 质粒组 HT9-neo 细胞中 MDR1 mRNA 的表达水平与 HT9 细胞相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 pSilencer3.1-shMDR1 质粒转染抑制 HT9 细胞中 P-gp 蛋白的表达

Western blotting 检测 HT9、HT9-neo、HT9-shMDR1 和 HL-60 细胞内 P-gp 蛋白的表达, 以 P-gp/ β -actin 比值确定蛋白相对含量。结果表明, 重组质粒 pSilencer3.1-shMDR1 转染可以显著降低 HT9 细胞 P-gp 蛋白的表达, 单克隆 HT9-shMDR1 细胞中 P-gp 蛋白的表达水平由转染前的 (1.454 ± 0.027) 降至转染后的 (0.856 ± 0.014) ($P < 0.05$), 而 HT9-neo 细胞组与 HT9 细胞相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。

2.5 pSilencer3.1-shMDR1 质粒转染增强 HT9 细胞

对大蒜素的敏感性

MTT 检测结果(表 1)显示,随着大蒜素质量浓度的增加,细胞存活率逐渐降低,其中 HT9-shMDR1 细胞降低最为明显。与 HT9 细胞相比,大蒜素对稳定表达 pSilencer3.1-shMDR1 的阳性单克隆细胞 HT9-shMDR1 的 IC_{50} 显著降低($P < 0.01$),而对 HT9-neo 细胞的 IC_{50} 无显著性差异($P > 0.05$)。以上结果说明,转染 pSilencer3.1-shMDR1 质粒能显著增强 HT9 细胞对大蒜素的敏感性。

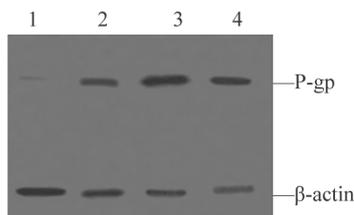


图 1 pSilencer3.1-shMDR1 转染抑制 HT9 细胞 P-gp 蛋白的表达

Fig. 1 Inhibition of P-gp protein expression in HT9 cells after pSilencer3.1-shMDR1 transfection

1:HL-60;2:HT9-shMDR1;3:HT9-neo;4:HT9

表 1 大蒜素对各白血病细胞的 IC_{50} 和相对耐药逆转率($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 IC_{50} of allicin to leukemia cells and the relative drug resistance reversal rate ($\bar{x} \pm s$)

Cell line	n	IC_{50} ($\rho_B/\mu g \cdot ml^{-1}$)	Relative reversal rate (%)
HT9	6	52.75 ± 0.64	
HT9-neo	6	50.43 ± 3.31	4.39 ± 0.46
HT9-shMDR1	6	26.66 ± 0.59**	49.45 ± 1.86
HL-60	6	21.95 ± 0.36**	

** $P < 0.01$ vs HT9 group

2.6 干扰 *MDR1* 表达促进大蒜素诱导的 HT9 细胞的凋亡

大蒜素(30 $\mu g/ml$)作用 24 h 后,凝胶电泳结果(图 2)显示,与 HT9 细胞相比,HT9-shMDR1 细胞的凋亡 DNA 梯带更明显,而 HT9-neo 细胞则没有出现 DNA 梯带。

2.7 干扰 *MDR1* 表达促进大蒜素诱导 HT9 细胞出现凋亡形态学变化

经 30 $\mu g/ml$ 大蒜素作用 24 h 后,HT9、HT9-

neo、HT9-shMDR1 细胞和 HL-60 细胞的超微结构发生显著变化(图 3)。未经处理的 HT9 细胞体积在 10 μm 左右,核浆比大,双层核膜清晰,核异形性明显,细胞表面可见大量微绒毛,胞质内线粒体轻度肿胀,粗面内质网较少,呈线条状,游离核蛋白体丰富。经大蒜素处理的 HT9 细胞膜性结构清晰,核膜完整,线粒体空泡变性,游离核蛋白体丰富,可见大量脂滴,细胞核固缩,异染色质边集在核膜下,呈早期凋亡状态;经大蒜素处理的 HT9-neo 细胞同 HT9 细胞,呈现早期凋亡状态。经大蒜素处理的 HT9-shMDR1 细胞核内异染色质边集于核一侧,呈月牙状,核膜清晰,细胞内膜结构完好,形成半月形凋亡。经大蒜素处理的 HL-60 细胞细胞器结构崩解消失,细胞核崩解呈碎片状。结果显示,与 HT9 细胞和 HT9-neo 细胞相比,转染 pSilencer3.1-shMDR1 质粒可以有效促进 HT9 细胞的凋亡。

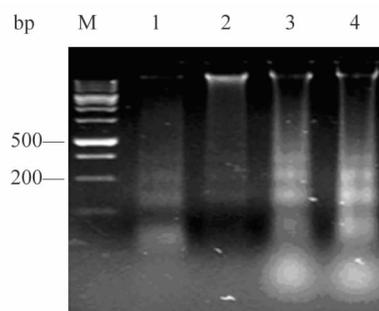


图 2 pSilencer3.1-shMDR1 质粒转染促进大蒜素处理的 HT9 细胞凋亡

Fig. 2 pSilencer3.1-shMDR1 promoted the apoptosis of HT9 cells treated with allicin

M: DNA marker; 1:HL-60; 2: HT9-shMDR1; 3: HT9; 4: HT9-neo

2.8 干扰 *MDR1* 表达促进大蒜素诱导 HT9 细胞阻滞于 G_2/M 期

HT9、HT9-neo、HT9-shMDR1 和 HL-60 细胞经大蒜素诱导 24 h 后,流式细胞术检测 pSilencer3.1-shMDR1 对 HT9 细胞周期的影响。结果(表 2)显示,大蒜素处理后,HT9 和 HT9-neo 细胞的细胞周期未发生显著变化,但 HT9-shMDR1 细胞的 S 期细胞比例减少[(31.40 ± 2.13)% vs (53.80 ± 1.87)% , $P < 0.01$], G_2/M 期细胞比例增多[(35.62 ± 2.06)% vs (9.37 ± 2.09)% , $P < 0.01$], G_0/G_1 期细胞比例无明显变化[(32.98 ± 1.33)% vs (36.83 ± 1.08)% , $P > 0.05$]。HL-60 细胞得到相

似结果,提示 HT9-shMDR1 和 HL-60 两种细胞经大蒜素处理后细胞周期阻滞于 G₂/M 期。

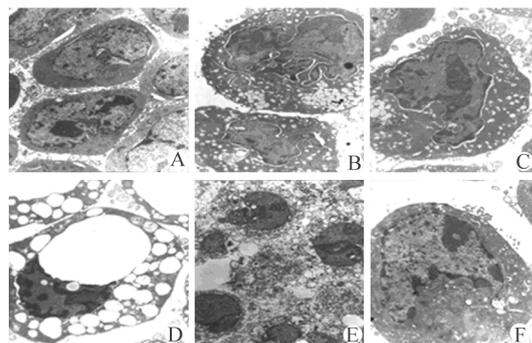


图 3 pSilencer3.1-shMDR1 质粒转染促进大蒜素诱导 HT9 细胞凋亡的形态学改变

Fig. 3 pSilencer3.1-shMDR1 promoted the morphological changes of HT9 cells treated with alliin

A: Untreated HT9 cells (× 3 000); B: HT9 cells treated with alliin (× 5 000); C: HT9-neo cells treated with alliin (× 3 600); D: HT9-shMDR1 cells treated with alliin (× 4 000); E: HL-60 cells treated with alliin (× 3 000); F: HL-60 cells (× 2 500)

3 讨论

白血病是常见的造血系统恶性肿瘤之一,目前联合化疗仍然是白血病治疗的重要措施,但白血病细胞 MDR 的产生使部分白血病的化疗最终归于失败。随着耐药机制研究的深入,各种耐药逆转剂也不断地涌现,主要包括基因治疗^[11]、免疫疗法^[12]和药物治疗。其中 RNA 干扰是近年来发展起来的一项特异性抑制基因表达的方法。RNA 干扰最主要的功能是调节和关闭特定基因的表达,进而调控细胞的各种高级生命活动。这一特异、有效的基因沉默技术现已被广泛应用于白血病多药耐药等方面的研究^[13-14]。张敏等^[15]研究了靶向 *MDR1* 4 个不同位点的 siRNA 对耐药细胞 MDR 的逆转效果,结果显示 4 条 siRNA 转染 72 h 后 K562/A02 细胞对多柔比星(adriamycin, ADR)的敏感性增强,相对逆转率依次为 90.61%、54.27%、96.39%、85.32%。在乳腺癌多药耐药研究^[16]中,针对 *ABCG2* 基因设计的 siRNA 有效抑制了该基因的表达。抑制胶质瘤、子宫恶性肿瘤、卵巢癌等多种肿瘤细胞中 MDR1 的表达均部分逆转了肿瘤细胞的化疗耐药性^[17-19]。

表 2 pSilencer3.1-shMDR1 质粒转染促进大蒜素诱导的 HT9 细胞周期的阻滞($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

Tab 2 pSilencer3.1-shMDR1 promoted HT9 cell cycle arrest induced by alliin($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

Cell line	Time for alliin treatment(t/h)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HT9	0	38.02 ± 1.49	51.88 ± 2.29	10.10 ± 1.04
	24	36.67 ± 1.54	52.57 ± 3.05	10.77 ± 1.74
HT9-neo	0	37.80 ± 1.53	49.75 ± 1.92	12.45 ± 1.82
	24	35.32 ± 2.34	49.01 ± 1.15	15.67 ± 1.21
HT9-shMDR1	0	36.83 ± 1.08	53.80 ± 1.87	9.37 ± 2.09
	24	32.98 ± 1.33	31.40 ± 2.13 **	35.62 ± 2.06 **
HL-60	0	32.30 ± 1.06	61.10 ± 4.16	6.60 ± 2.74
	24	27.90 ± 2.51	28.93 ± 3.75 **	43.20 ± 1.76 **

** P < 0.01 vs 0 h in the same cell line

本实验成功构建了靶向 *MDR1* 的 shRNA 表达载体 pSilencer3.1-shMDR1,稳定转染后,经 real-time PCR 和 Western blotting 检测,白血病 HT9 细胞中 *MDR1* 基因的表达降低了 75.4% (P < 0.01), *MDR1* 基因的表达产物 P-糖蛋白的表达降低了 41.13% (P < 0.05)。众所周知,P-gp 能将化疗药物泵出细胞外,使细胞内药物浓度始终抑制在低水平,减弱了

药物的细胞毒作用。大蒜素对 pSilencer3.1-shMDR1 转染后 HT9-shMDR1 细胞的 IC₅₀ 值由转染前对 HT9 细胞的 (52.75 ± 0.64) μmol/L 降至 (26.66 ± 0.59) μmol/L (P < 0.01),其相对耐药逆转率为 49.45%。

大蒜素是大蒜中主要生物活性成分的总称,是多种烯丙基有机硫化物复合体。自 20 世纪 80 年代

以来,有关大蒜素防癌作用的研究日益受到国内外学者的关注。大蒜素对胃癌、结肠癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌、白血病^[20]等多种肿瘤均有明显抑制作用,且毒性作用较小。研究^[21]表明,大蒜素能将人白血病 HL-60 细胞周期阻滞于 G₂/M 期。通过研究^[21]发现,20、40、60 μg/ml 大蒜素均能抑制 HL-60 细胞生长,其抑制作用呈剂量-效应关系,40 μg/ml 大蒜素能诱导 HL-60 细胞出现典型凋亡形态学变化。本实验也得到相似的结果。

本实验用大蒜素分别处理化疗敏感的 HL-60 细胞、耐药 HT9 细胞和 pSilencer3.1-shMDR1 重组质粒转染后的 HT9-shMDR1 细胞,研究 *MDR1* 对大蒜素耐药的影响。DNA 凝胶电泳结果显示,与 HT9 细胞相比,HT9-shMDR1 细胞凋亡的 DNA 梯带更明显;在透射电镜下,经大蒜素处理的 HT9 细胞和 HT9-neo 细胞呈早期凋亡状态,而经大蒜素处理的 HT9-shMDR1 细胞可见凋亡小体形成,凋亡程度大于 HT9 细胞;另外,利用流式细胞术检测大蒜素对细胞周期的影响,结果显示,大蒜素处理后的 HT9-shMDR1 和 HL-60 细胞的细胞周期阻滞于 G₂/M 期,HT9 和 HT9-neo 细胞的细胞周期未发现显著变化。

本实验用 RNAi 沉默 *MDR1* 基因之后,能明显逆转白血病耐药 HT9 细胞对大蒜素的耐药性,但关于细胞多药抗性和凋亡之间的关系及机制还有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(3): 273-286.
- [2] Pan GD, Yang JQ, Yan LN, et al. Reversal of multi-drug resistance by pSUPER-shRNA-mdr1 *in vivo* and *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(4): 431-440.
- [3] Honjo K, Takahashi KA, Mazda O, et al. MDR1a/1b gene silencing enhances drug sensitivity in rat fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Gene Med*, 2010, 12(2): 219-227.
- [4] Borst P, Jonkers J, Rottenberg S. What makes tumors multidrug resistant? [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(22): 2782-2787.
- [5] Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 385-427.
- [6] Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, et al. RNA interference in the clinic: Challenges and future directions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(1): 59-67.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Borel F, van Logtenstein R, Koomneef A, et al. *In vivo* knockdown of multidrug resistance transporters ABCB1 and ABCB2 by AAV-delivered shRNAs and by artificial miRNAs [J]. *J RNAi Gene Silencing*, 2011, 7: 434-442.
- [10] Lin SL, Kim H, Ying SY. Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA) [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2216-2230.
- [11] Rumpold H, Wolf AM, Gruenewald K, et al. RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(7): 767-775.
- [12] Niethammer AG, Wodrich H, Loeffler M, et al. Multidrug resistance-1 (MDR-1): A new target for T cell-based immunotherapy [J]. *FASEB J*, 2005, 19(1): 158-159.
- [13] Logashenko EB, Vladimirova AV, Repkova MN, et al. Silencing of *MDR1* gene in cancer cells by siRNA [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2004, 23(6/7): 861-866.
- [14] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(10): 850-862.
- [15] 张敏,李勇莉,高建凯,等. 靶向 mdr1 不同位点的 siRNA 对两种耐药细胞 MDR 的逆转效果 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(33): 3387-3393.
- [16] Ee PL, He X, Ross DD, et al. Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(12): 1577-1583.
- [17] Zhao P, Zhang Y, Sun M, et al. Reversion of multidrug resistance in human glioma by RNAi interference [J]. *Neurol Res*, 2008, 30(6): 562-566.
- [18] Hua J, Mutch DG, Herzog TJ. Stable suppression of MDR-1 gene using siRNA expression vector to reverse drug resistance in a human uterine sarcoma cell line [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 98(1): 31-38.
- [19] Halder J, Landen CN Jr, Lutgendorf SK, et al. Focal adhesion kinase silencing augments docetaxel-mediated apoptosis in ovarian cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24 Pt 1): 8829-8836.
- [20] Yang JS, Kok LF, Lin YH, et al. Diallyl disulfide inhibits WEHI I-3 leukemia cells *in vivo* [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(1A): 219-225.
- [21] 郝艳梅,张林杰,李玉云,等. 大蒜素对人白血病 HL-60 细胞生长和凋亡的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2007, 32(3): 268-270.

【收稿日期】 2012-08-20

【修回日期】 2013-12-15

【本文编辑】 周玲琳