

RNA 干扰沉默缺氧诱导因子 1 α 逆转肺癌细胞耐药性

刘胜岗¹ 陈 琼^{2△} 何白梅² 陈 莹³ 聂华萍¹ 梁伟军¹

(1 长沙市中心医院呼吸内科 湖南 长沙 410000 2 中南大学湘雅医院老年医学科 湖南 长沙 410078 ;

3 湖南省人民医院肾内科 湖南 长沙 410005)

摘要 目的 :观察 RNA 干扰沉默缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)对肺癌细胞耐药性的影响。方法 :构建靶向 HIF-1 α 小干扰 RNA 基因 ,并转染到人肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP 细胞中。逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测细胞的 HIF-1 α 、多药耐药基因 1 (MDR-1) 以多药耐药相关蛋白基因 (MRP) mRNA 变化 ,免疫细胞化学法观察干扰后 HIF-1 α 、P- 糖蛋白以及 MRP 蛋白的变化。MTT 法检测不同浓度的顺铂作用下细胞死亡率。结果 :HIF-1 α siRNA 组中 HIF-1 α 、MDR-1、MRP mRNA 水平显著降低 ($P<0.05$) ,且蛋白水平也显著下降 ($P<0.05$)。HIF-1 α siRNA 组细胞死亡率较未转染组均明显增高 ($P<0.05$) 转染 siRNA 阴性组不影响肿瘤细胞的耐药性。结论 :HIF-1 α siRNA 可显著降低 A549/DDP 细胞中 HIF-1 α 、MDR-1、MRP 表达 ,从而起到逆转肺腺癌 A549/DDP 细胞的耐药作用。

关键词 小 RNA 干扰 ;低氧诱导因子 -1 α ;多药耐药基因 1 ;多药耐药相关蛋白

中图分类号 R562 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)13-2486-04

Reversing the Multidrug Resistance of Human Pulmonary Adenocarcinoma Cells by RNA Interference Targeting HIF-1 α Gene

LIU Sheng-gang¹, CHEN Qiong^{2△}, HE Bai-me², CHEN Ying³, NIE Hua-ping¹, LIANG Wei-jun¹

(1 Department of respiration, Changsha Central Hospital, Changsha 410000, China;

2 Department of Geriatric Medicine, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410000, China;

3 Department of Nephrology, the Provincial People's Hospital of Hunan, Changsha 410005, China)

ABSTRACT Objective: To reverse the multidrug resistant (MDR) phenotype of human lung cancer cells by small interference RNA (siRNA) technique targeting hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene. **Methods:** Small interference RNA eukaryotic expression vector targeting HIF-1 α gene was constructed and transfected into human adenocarcinoma A549/DDP cells by liposome technique. The mRNA and protein expression levels of HIF-1 α , MDR-1 and MRP were investigated by RT-PCR and immuocytochemistry. The mortality of cells was observed by MTT in different groups treated with cisplatin of different concentrations. **Results:** mRNA and protein levels of HIF-1 α , MDR-1 and MRP were significantly decreased in HIF-1 α siRNA group. The MTT assays showed the mortality in HIF-1 α siRNA group was significantly higher than that in non-transfected group ($P<0.05$). The negative siRNA transfection did not affect the resistance of tumor cells. **Conclusion:** HIF-1 α siRNA significantly reduced the expression of HIF-1 α , MDR-1 and MRP in A549/DDP cells and thus played a role in reversing drug resistance.

Key words: Small interference RNA; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Multidrug-resistance-1; Multidrug resistance-associated protein

Chinese Library Classification(CLC): R562 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)13-2486-04

前言

肺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一,化疗是其重要的治疗手段之一。但是,肺癌细胞多药耐药(MDR)现象的产生往往导致肺癌化疗的失败。逆转肺癌的MDR是目前亟待解决的问题。以往的研究发现,p-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP)的表达与肺癌细胞的多药耐药密切相关^[1],有效的抑制肺癌细胞中P-gp、MRP的表达可以逆转肺癌细胞的多药耐药。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是一种在缺氧条件下广泛存在于人和动物的肿瘤细胞内的转录因子。HIF-1 α 可以诱导药泵蛋白

如P-gp、MRP的表达增加而产生MDR^[2,3]。本研究拟设计合成针对HIF-1 α 基因的小干扰RNA,转染入低氧情况下A549/DDP细胞中,抑制其HIF-1 α 的表达,观察其对MDR1、MRP表达以及A549/DDP细胞对顺铂化疗耐药性的影响,为肺癌细胞的MDR提供新的靶点和理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP购自中南大学湘雅医学院细胞中心。细胞株按常规方法进行培养,培养液为含10%胎牛血清的RPMI1640培养液,均以200 μ mol/ml的CoCl₂作用于细胞形成化学性缺氧^[4],取对数生长期细胞进行实验。

1.2 酶和试剂

逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为MBI公司产品,Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,HIF-1 α 抗体、抗P-糖蛋白单克隆抗体、抗MRP蛋白单克隆抗体购自北京中杉金

作者简介 刘胜岗(1978-)男,主治医师,主要从事肺癌耐药研究,电话:13875860403 E-mail:liu78615@sina.com。

△通讯作者 陈琼,教授,博士生导师,主要从事肺癌的基础研究,chengqiong@hotmail.com

(收稿日期 2011-03-10 接受日期 2011-03-31)

桥生物技术公司。

1.3 真核表达载体的构建

根据 GenBank 中 HIF-1α 人全长 cDNA 序列 (NO. 22431) 选择 GC 比例 40%~55% 的序列设计出 RNA 干扰靶点 :AAG - AGGTGGATATGTCTGG。根据 siRNA 靶位点 ,人工合成一对互补并编码短发夹状 siRNA 的寡核苷酸链 ,序列为 dtdtAAGA - GGUGGAUAUGUCUGG - dtdtUUCUCCACCUAUACAGACC (广州瑞博生物技术公司构建)。

1.4 脂质体介导转染 A549/DDP 细胞

A549/DDP 细胞按每孔细胞数达 1×10⁵ 接种到 6 孔细胞培养板中 ,用含 200μmol/ml 的 CoCl₂ 的 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液加满至 2ml 培养 24 小时细胞密度达 30%-50%后换优化培养基 1.5ml ,培养 1 小时→A 液 :5μl 脂质体 2000 加入 45μl 的优化培养基中 ,室温 5 分钟→B 液 :5μl HIF-1α siRNA 加入到 45μl 的优化培养基中 ,室温 5 分钟→C 液 :A 液和 B 液混和 ,室温 20 分钟→将 C 液加入相应的孔中→6 小时后换含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液 2ml→24-48 h 后抽提 RNA、固定细胞分别行 RT-PCR 及免疫细胞化学检测。实验设对照组、HIF1αsiRNA 组、无目标 siRNA 组。

1.5 RT-PCR 检测

提取细胞总 RNA ,进行逆转录反应 ,随后进行 32 个循环的 PCR 扩增。HIF-1α (product: 436bp)上游引物 5'- ATACCA - ACAGTAACCAACCT-3' ,下游引物 5' TGAATAATACCACT - CACAAC -3' ;MDR (product: 334bp)上游引物 5' -GAAGGAA - AAGAAACCAAC -3' 下游引物 5' CAGGCACCAAAATGAA - AC-3' ;MRP (product: 314bp) 上游引物 :5' TCGCTCACCCCT - GTTCTC-3' ,下游引物 5' CCACCTCCTCATTCGCAT-3' β-actin (product:170bp) 上游引物 5'-CTGGCACCACACCTTCTACAA - TGAGC-3' ,下游引物 5' -GGGATAGCACAGCCTGGATAGCA - ACG-3'(上海生工合成)。取扩增产物 2%凝胶电泳 ,用凝胶图像

分析仪分析。实验指数 = 实验值 /β-actin 值 ,实验重复 3 遍 ,取平均值。

1.6 HIF-1α、P-gp、MRP 蛋白表达检测

采用免疫细胞化学 SP 法。HIF-1α、P-gp 、MRP 抗体的效价均为 1 :100。细胞爬片后 ,4%多聚甲醛固定 ,PBS 洗 3 次 ,3%过氧化氢室温孵育 15 min ,PBS 洗 3 次 ,山羊血清室温孵育 15 min ,分别加入一抗 ,4℃过夜 ,PBS 洗 3 次 ,加入通用型生物素标记的二抗室温孵育 20 min ,PBS 洗 3 次 ,加入辣根酶标记链酶卵白素工作液室温孵育 20 min ,DAB 显色 ,苏木素复染 ,脱水封片。结果以阳性蛋白积分表示^[5,6]。

1.7 MTT 法检测顺铂化疗耐药性

对照组和实验组 96 孔细胞培养板中正常培养 24 h 后 ,分别加入不同浓度的顺铂 ,浓度分别为 0μg/ml、10μg/ml、40 μg/ml、80μg/ml、100μg/ml、200g/ml ,每板均设立空白孔和未加药物孔。培养结束后加入 MTT 20μl/ 孔孵育 4 h ,到掉 MTT ,加入 DMSO 150μl/ 孔作用 15min ,酶标仪 570nm 波长检测吸光度 ,计算细胞死亡率。死亡率 = (1- 实验组 OD/ 对照组 OD)× 100%。

1.8 统计学分析

应用 SPSS12.0 软件系统进行统计分析 ,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多个样本均数两两之间全面比较用 SNK-q 检验 ,所有统计均为双侧 ,显著性检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测细胞 mRNA 变化

低氧组与常氧组之间 HIF-1α、MDR-1、MRPmRNA 指数差异均有统计学意义(P<0.05);阴性 siRNA 转染组与低氧组之间 HIF-1α、MDR-1、MRPmRNA 指数差异无统计学意义(P>0.05) ;阳性 siRNA 转染组与低氧组之间 HIF-1α、MDR-1、MRPmRNA 指数差异均有统计学意义(P<0.05)(图 1a-c 表 1)。

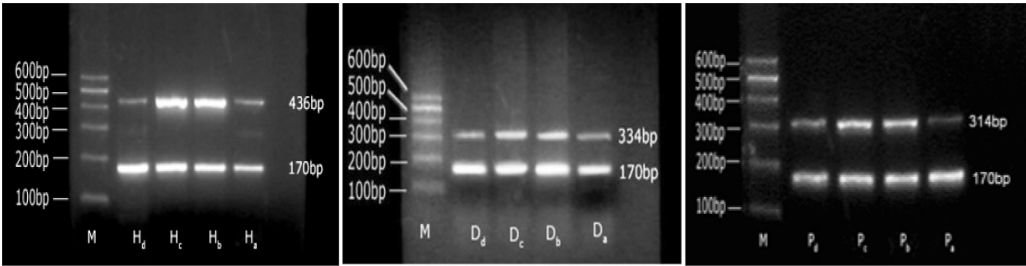


图 1 a) HIF-1α mRNA ,b) MDRmRNA ,c)MRPmRNA

Fig.1 a) HIF-1α mRNA ,b) MDRmRNA ,c)MRPmRNA

表 1 不同组细胞中 HIF-1α 、MDR、MRP mRNA 表达相对量

Table1 The relative amount of HIF-1α , MDR-1, and MRP mRNA expression in different groups

Group	HIF-1α mRNA	MDR mRNA	MRP mRNA
A549/DDP normoxia group	0.49± 0.01	0.30± 0.01	0.21± 0.01
A549/DDP hypoxia group	0.98± 0.01 *	0.45± 0.04*	0.91± 0.01 *
siRNA Negative group	0.98± 0.02	0.48± 0.02	0.90± 0.02
siRNA positive group	0.57± 0.05 △	0.35± 0.04 △	0.60± 0.09 △

注 :与常氧组比较 ,*P<0.05 ,与低氧组比较 ,△P<0.05

Note: compared with normoxia group*P<0.05; compared with hypoxia group △P<0.05

2.2 免疫细胞化学检测蛋白变化

低氧组与常氧组之间 HIF-1α、MDR-1、MRP 蛋白指数差异均有统计学意义 (P<0.05) ,阴性 siRNA 转染组与低氧组之间

HIF-1α、MDR-1、MRP 蛋白指数差异无统计学意义(P>0.05) ,阳性 siRNA 转染组与低氧组之间 HIF-1α、MDR-1、MRP 蛋白指数差异均有统计学意义(P<0.05)(图 2 3 4 表 2)。

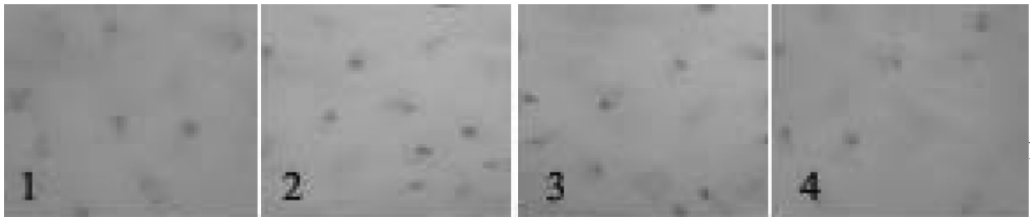


图2 各组细胞 HIF-1 α 蛋白 的表达,×200 (1 常氧组 2 低氧组 3 siRNA 阴性组 4 siRNA 阳性组)
Fig.2 Expression of HIF-1 α protein in cells of each group, ×200
(1 normoxia group; 2 hypoxia group; 3 siRNA Negative group; 4 siRNA positive group)

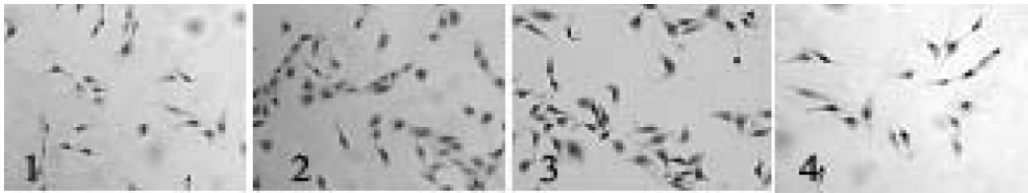


图3 各组细胞 MDR1 蛋白 的表达, ×200 (1 常氧组 2 低氧组 3 siRNA 阴性组 4 siRNA 阳性组)
Fig.3 Expression of MDR1 protein in cells of each group, ×200
(1 normoxia group; 2 hypoxia group; 3 siRNA Negative group; 4 siRNA positive group)

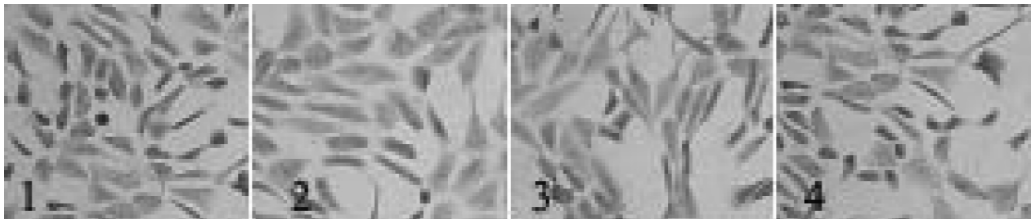


图4 各组细胞 MRP 蛋白 的表达,×200 (1 常氧组 2 低氧组 3 siRNA 阴性组 4 siRNA 阳性组)
Fig.3 Expression of MRP protein in cells of each group, ×200
(1 normoxia group; 2 hypoxia group; 3 siRNA Negative group; 4 siRNA positive group)

表 2 不同组细胞中 HIF-1 α 、MDR1、MRP 蛋白的阳性系数

Table 2 The positive coefficient of HIF-1 α , MDR1 and MRP protein in different groups

Group	HIF-1 α mRNA	MDR mRNA	MRP mRNA
A549/DDP normoxia group	2.57 $\pm$ 0.36	1.71 $\pm$ 0.40	2.31 $\pm$ 0.39
A549/DDP hypoxia group	4.00 $\pm$ 0.59 *	2.92 $\pm$ 0.55*	3.51 $\pm$ 0.08*
siRNA Negative group	4.02 $\pm$ 0.14	2.78 $\pm$ 0.15	3.49 $\pm$ 0.11
siRNA positive group	2.97 $\pm$ 0.09 Δ	2.18 $\pm$ 0.15 Δ	2.78 $\pm$ 0.09 Δ

Note: compared with normoxia group*P<0.05; compared with hypoxia group Δ P<0.05

2.3 MTT 法检测顺铂作用下细胞死亡率

顺铂作用后 3 组细胞死亡率的变化 经两水平两因素析因分析, 阴性 siRNA 转染组与对照组之间细胞死亡率差异无统

计学意义(P>0.05), 阳性 siRNA 转染组与对照组、阴性 siRNA 转染组之间细胞死亡率差异均有统计学意义(P<0.05)(表 3)。

表 3 MTT 法测不同浓度顺铂处理后各组细胞的死亡率变化(%)($\bar{X} \pm S$)

Table 3 The mortality rate(%)of pulmonary adenocarcinoma cells in different groups treated with cisplatin measured by MTT assay($\bar{X} \pm S$, n=6)

Group	10 μ mol/l	40 μ mol/l	80 μ mol/l
A549/DDP normoxia group	19.8 $\pm$ 0.2	39.0 $\pm$ 0.3	56.5 $\pm$ 0.2
A549/DDP hypoxia group	4.0 $\pm$ 0.3*	13.5 $\pm$ 0.3*	24.3 $\pm$ 0.2*
siRNA Negative group	4.2 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.2	25.8 $\pm$ 0.3
siRNA positive group	15.1 $\pm$ 0.3 Δ	31.3 $\pm$ 0.2 Δ	49.8 $\pm$ 0.3 Δ

Note: compared with normoxia group*P<0.05; compared with hypoxia group Δ P<0.05

3 讨论

化疗是肺癌治疗的重要手段之一,而肺癌细胞 MDR 现象的产生往往导致肺癌化疗的失败。以往的研究表明 P-gp、MRP 与肺癌的多药耐药关系密切^[1]。Holzmayer 等^[7]用 RT-PCR 方法测定 24 例未经治疗和 4 例治疗的肺癌标本,发现 80%未经治疗的肺腺癌和 4 例已经化疗治疗的肺癌均有 MDR1 mRNA 表达。Eijdem 等^[8]发现人非小细胞肺癌细胞株(SW-1573)中 MRP mRNA 水平增加。Narasaki 等^[9]发现许多肺癌组织同时表达 MRP 和 MDR1。而大量研究表明肿瘤细胞的缺氧与肿瘤 MDR 有着密切关系,而 HIF-1 α 是一种缺氧条件下发挥重要作用的转录因子^[10-12]。HIF-1 α 可以诱导药泵蛋白如 P-gp、MRP 的表达而产生 MDR^[2,3]。Wartenberg 等^[13]研究发现肿瘤细胞缺氧时 HIF-1 α 增高,且 HIF-1 α 可以上调 P-gp 的蛋白表达。最近在人肺腺癌细胞株 (A549) 中研究发现 HIF-1 α 、MDR1 及 MRP 在低氧下比常氧下表达更高^[10],而且 HIF-1 α 与 MDR1、MRP 的表达呈明显相关性^[3]。

近几年来 RNAi 技术的出现为肿瘤 MDR 的研究提供了新的途径。到目前为止,已有许多关于应用 RNAi 技术研究肿瘤 MDR 的报道。Nieth 等^[14]应用 RNAi 技术,将设计好的针对 MDR1 的 siRNA 分别转入人胰腺细胞株 (EPP85-181RDB)和胃癌细胞株(EPG85-257RDB)中,结果可特异的抑制 MDR1 在 mRNA 和蛋白水平表达达至 91%,两种细胞对阿霉素耐药分别下降 89%和 58%。Duan 等^[15]利用针对 MDR1 的 siRNA 转入人耐泰素的人卵巢癌细胞株(SKOV-3TR 和 OVCAR8TR)中,结果 siRNA 可特异抑制 MDR1 mRNA 和蛋白的表达,两细胞株对泰素的耐药下降 7 倍和 12.4 倍。本研究针对缺氧培养条件下的 A549/DDP 细胞转染 HIF-1 α siRNA, HIF-1 α 沉默后,MDR-1、MRP mRNA 水平也明显降低,表明干扰 HIF-1 α 的表达可以抑制 MDR-1、MRP 基因的转录。免疫细胞化学检测结果证实蛋白水平上细胞中 P-gp、MDR-1、MRP 蛋白的表达亦下调,说明 HIF-1 α siRNA 可通过抑制 MDR-1、MRP 基因的转录而下调 MDR-1、MRP 蛋白的表达。MTT 法检测细胞死亡率由 76%下降到 43%,提示 HIF-1 α siRNA 可以显著降低 P-gp 及 MRP 蛋白的功能,有逆转 MDR 的作用。本实验结果说明缺氧与肿瘤的 MDR 密切相关,通过 RNA 干扰技术抑制肿瘤细胞中 HIF-1 α 的表达可逆转肿瘤的 MDR,为在体内应用 RNA 干扰 HIF-1 α 基因治疗肿瘤提供了理论基础。

参考文献(References)

- [1] Vanden HE, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2000, 38(3):94-110
- [2] Park S, Ha SY, Cho HY, et al. Prognostic implications of hypoxia-inducible factor-1 α in epidermal growth factor receptor-negative non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2010, 3. [Epub ahead of print]
- [3] Yoo YG, Christensen J, Huang LE. HIF-1 { α } Confers Aggressive Malignant Traits on Human Tumor Cells Independent of Its Canonical Transcriptional Function[J]. Cancer Res, 2011, 71(4):1244-1252

- [4] 徐瑞华,袁中玉,管忠震,等. 基因工程腺病毒 H101 逆转 A549/DDP 细胞对顺铂耐药性的实验研究[J]. 癌症, 2005, 24(8):975-979
Xu Rui-Hua, Yuan Zhong-Yu, Zhe Guan-Zhong, et al. Reverse Effect of Genetically Modified Adenovirus H101 on Drug-resistance of A549/DDP Cells to Cisplatin [J]. Chinese Journal of Cancer, 2005, 24(8): 975-979
- [5] 胡淳玲,喻伦银,陈德基,等. 大鼠试验性肺鳞癌变各阶段间质微血管密度及 VEGF/FLK-1 表达的动态变化 [J]. 癌症, 2001, 20(7): 713-717
Hu Chun-ling, Yu Lun-yin, Chen De-ji, et al. Changes of VEGF, FLK-1 Expressions and Vasculature during Lung Carcinogenesis Induced by 3-Methylcholanthrene and Diethylnitrosamine in Wistar Rats [J]. Chinese Journal of Cancer, 2001, 20(7):713-717
- [6] 于观贞,朱明华,倪灿荣,等. 胰腺癌 p53 上下游基因 mdm2, p21-WAF/CIP1 以及 p14-ARF 蛋白的表达及相互关系 [J]. 中华病理学杂志, 2004, 33(2):130-134
Yu Guan-zhen, Zhu Ming-hua, Ni Can-rang, et al. Expression of proteins in p53 (p14~(ARF)- mdm2- p53-n21~(WAF/CIP1)) pathway and their significance in exocrine pancreatic carcinoma [J]. Chinese Journal of Pathology, 2004, 33(2):130-134
- [7] Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von Hoff DD, et al. Clinical correlates of MDR1(P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(19):1486-1491
- [8] Eijdem EW, De Haas M, Coco-Martin JM, et al. Mechanisms of MRP over expression in four human lung cancer cell lines and analysis of the MRP amplicon[J]. Int J Cancer, 1995, 60(5):676-684
- [9] Narasaki F, Matsuo I, Ikuno N, et al. Multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression in human lung cancer [J]. Anticancer Res, 1996, 16 (4A):2079-2082
- [10] Lin HH, Tsai CW, Chou FP, et al. Andrographolide down-regulates hypoxia-inducible factor-1 α in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 250(3):336-345
- [11] Choi YJ, Rho JK, Lee SJ, et al. HIF-1 α modulation by topoisomerase inhibitors in non-small cell lung cancer cell lines [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(8):1047-1053
- [12] Wu XH, Qian C, Yuan K. Correlations of hypoxia-inducible factor-1 α /hypoxia-inducible factor-2 α expression with angiogenesis factors expression and prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(1):11-18
- [13] Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species [J]. FASEB J, 2003, 17(3):503-505
- [14] Nieth C, Priebisch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi) [J]. FEBS Letters, 2003, 545(2-3):144-150
- [15] Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, et al. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(4):1000-1004