

沉默MDR1基因增强急性早幼粒白血病耐药细胞HT9药物敏感性

邵淑丽* 李旭艳 张伟伟 恽东泽 付 博 张珍珠

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 该研究利用短发卡RNA(small hairpin RNA, shRNA)表达载体沉默HT9急性早幼粒白血病耐药细胞MDR1基因表达,以提高细胞对三尖杉酯碱、阿霉素的敏感性。通过设计合成编码shRNA的DNA模板序列,定向克隆到pSilencer 2.1-U6 neo质粒,成功构建1个P-gp蛋白基因特异的shRNA表达载体,稳定电转染HT9细胞,实时荧光定量PCR分析MDR1 mRNA表达,Western blot检测细胞P-gp蛋白表达,流式细胞术检测P-gp蛋白外排泵功能,MTT法检测细胞对药物敏感性。结果显示,成功构建了shRNA表达载体pSilencer 2.1-U6 neo-MDR1,转染HT9细胞后,PCR检测重组质粒整合到HT9/sh-2.1-1细胞基因组DNA,获得稳定遗传;HT9/sh-2.1-1细胞MDR1 mRNA表达降低了78.84%($P<0.01$),P-gp蛋白表达降低了48.27%($P<0.05$),细胞内Rho123相对荧光强度由(10.8±0.58)%升高至(73.56±1.37)%;转染细胞对三尖杉酯碱、阿霉素敏感性明显增强,IC₅₀分别由(2.06±0.15) μmol/L降至(0.57±0.01) μmol/L、(4.04±0.17) μmol/L降至(1.56±0.05) μmol/L。提示shRNA干扰表达载体pSilencer 2.1-U6 neo-MDR1能够稳定、持久地抑制MDR1基因表达,并能有效增强HT9细胞对三尖杉酯碱、阿霉素的敏感性。

关键词 短发卡RNA; MDR1基因; HT9细胞; 三尖杉酯碱; 阿霉素

联合化疗为白血病治疗的主要手段,但随着化疗时间的延长,白血病细胞逐渐对各种化疗药物产生耐药性。因此,对耐药机制及化疗增敏剂的研究在临床上具有重要意义。肿瘤耐药产生的机制较为复杂,包括P-糖蛋白(permeability glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)等膜糖蛋白介导的药物外排机制, Bcl-2、p53等基因异常表达介导的耐药, DNA拓扑异构酶、谷胱甘肽-S-转移酶等酶活性、结构改变导致的耐药^[1]。其中,MDR1/P-gp的过表达成为经典的多药耐药表型^[2],通过对P-gp的检测,可以判断白血病病人对当前化疗药物是否有抗性。P-gp是一种ATP依赖性药物外排泵,能利用ATP水解释放的能量主动地将疏水亲脂性药物(秋水仙碱、阿霉素、长春新碱等)转运至细胞外,导致细胞内药物浓度低于杀伤浓度,还可使细胞内药物再分布,减少作用靶点部位的药物浓度,从而导致耐药^[3]。科学研究及临床曾采用多种方式部分或全部恢复肿瘤细胞对药物的敏感性,如耐药逆转剂、免疫治疗、基因治疗等^[4]。目前, RNA干扰(RNA interference, RNAi)已成功应用于肿瘤基因功能和基因治疗的研究^[5-7],通过内外源性双

链RNA(dsRNA)触发同源性耐药基因的mRNA降解,从而使耐药基因表达沉寂,进而增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。本研究应用RNA干扰技术,采用MDR1-shRNA真核表达载体转染白血病多药耐药HT9细胞,观察细胞MDR1 mRNA和P-gp蛋白表达与三尖杉酯碱、阿霉素敏感性的相关性,为临床化疗耐药的个体化化疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞株 人急性早幼粒白血病细胞株HL60、耐三尖杉酯碱的HL60细胞株HT9由北京师范大学生命科学院提供, pSilencer 2.1-U6 neo由北京鼎国生物技术有限责任公司惠赠。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640培养基、胎牛血清购自上海生工生物工程技术有限公司,细胞基因组DNA提取试剂盒、PCR试剂盒购自北京鼎国

收稿日期: 2012-05-17 接受日期: 2012-07-11

黑龙江省自然科学基金(No.C200624)和黑龙江省教育厅科学技术项目(No.11511447, No.12511611)资助项目

*通讯作者。Tel: 0452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

生物技术有限责任公司。鼠抗人单克隆抗体C219、HRP标记山羊抗鼠二抗为中山金桥产品,三尖杉酯碱、阿霉素购于北京协和制药厂,MTT购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 MDR1基因shRNA表达载体的构建 根据GenBank中P-gp蛋白编码基因MDR1 mRNA的已知序列(NM_000927),选择1个shRNA特异性靶位点序列,设计合成编码shRNA的DNA模板序列:正义链:5'-GAT CCg gag gcc aac ata cat gcc T TC AAG AGA ggc atg tat-3',反义链:5'-gtt ggc ctc cTT TTT TGG AAA-3',退火形成双链后定向克隆到pSilencer 2.1-U6 neo载体上,shRNA重组质粒命名为pSilencer 2.1-U6-MDR1。连接产物转化,提取质粒,测序证实插入序列为所设计的发卡序列。大量提取纯化质粒,待转染。

1.2.2 细胞培养及转染 细胞培养过程中,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周用不含三尖杉酯碱的培养液培养。取对数生长期的HT9细胞,通过pEGFP-N1质粒优化电转染条件,将线性化的pSilencer 2.1-U6-MDR1重组质粒、pSilencer 2.1-U6 neo空质粒载体于最佳电转染条件下转染HT9细胞,转染后用600 $\mu\text{g/mL}$ G418筛选建立稳定表达siRNA的HT9细胞克隆,有限稀释法挑取单克隆转染细胞。实验分为四组,HT9/sh-2.1-1组:为转染pSilencer 2.1-U6-MDR1重组质粒的HT9细胞,特异性干扰目的基因MDR1表达;HT9/sh-2.1组:为空载体对照转染组,对目的基因MDR1表达无干扰作用;HT9细胞为耐药非转染对照组;HL60细胞为非耐药对照组。

1.2.3 PCR检测转染细胞总DNA中重组载体的存在 转染单克隆细胞扩大培养后,提取各组细胞总DNA进行PCR。引物正义链:5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3',引物反义链5'-GAG TTA GCT CAC TCA TTA GGC-3',扩增产物为560 bp。PCR扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,循环35次;72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。经1.5%琼脂糖凝胶检测,凝胶成像系统进行摄影记录。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测MDR1-mRNA表达 采用UNI-Q-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒(Sangon)提取HL60、HT9、HT9/sh-2.1、HT9/sh-2.1-1各组细胞总RNA。MDR1正义链:5'-ATA TCA GCA GCC CAC ATC AT-3',MDR1反义链:5'-GAA GCA CTG GGA TGT CCG GT-3',扩增产物为154 bp。以 β -actin为

内参照, β -actin正义链:5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3', β -actin反义链:5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3',扩增产物为318 bp。实时荧光定量PCR扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,循环35次;72 $^{\circ}\text{C}$ 检测信号,循环结束后进行溶解曲线检测。实验重复3次,数据以 $\text{power}(2, -\text{ddC}_t)$ 进行计算。

1.2.5 Western blot检测P-gp蛋白表达 收集HL60、HT9、HT9/sh-2.1、HT9/sh-2.1-1各组细胞,提取总蛋白,样品进行SDS-PAGE凝胶电泳后,电转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入鼠抗人P-糖蛋白单克隆抗体C219(1:40),室温孵育1.5 h, PBS洗膜,加入HRP标记的山羊抗鼠二抗(1:5 000),室温孵育1.5 h, ECL发光液显影、定影、洗片,用凝胶图像分析软件分析X光片灰度值。

1.2.6 流式细胞术检测P-gp蛋白外排泵功能 收集HL60、HT9、HT9/sh-2.1、HT9/sh-2.1-1各组细胞,分别与10 $\mu\text{g/mL}$ 的Rho123混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,用预冷的PBS洗3次,重悬于预冷的PBS中,流式细胞仪检测细胞内Rho123荧光强度。

1.2.7 MTT法检测耐药细胞对药物敏感性 收集对数生长期的HL60、HT9、HT9/sh-2.1、HT9/sh-2.1-1细胞,以每孔 1×10^4 细胞接种于96孔板,分别加入终浓度为0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 的三尖杉酯碱、阿霉素,采用常规条件培养48 h时,常规四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)于570 nm下测吸光度值D。计算细胞存活率 $=D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$,以药物浓度为横轴,细胞存活率为纵轴绘制浓度效应曲线,求出回归方程,确定半数抑制浓度(IC₅₀),并计算相对逆转率,逆转率 $=(\text{IC}_{50\text{A}} - \text{IC}_{50\text{B}})/(\text{IC}_{50\text{A}} - \text{IC}_{50\text{C}}) \times 100\%$,IC_{50A}、IC_{50B}、IC_{50C}分别代表逆转前耐药细胞、逆转后耐药细胞和亲本敏感细胞的IC₅₀值,实验重复3次。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计学软件进行数据处理,进行单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较用LSD法检测其差异性,数据均以平均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR鉴定转染细胞中重组载体的存在

HT9/sh-2.1、HT9/sh-2.1-1细胞DNA扩增产物均

出现一条约560 bp条带(图1), HT9/sh-2.1-1细胞DNA扩增产物略大于HT9/sh-2.1细胞DNA扩增产物, 表明HT9/sh-2.1-1细胞成功转染了带有干扰片段的重组质粒, HT9/sh-2.1细胞转染的是质粒空载体, 结果进一步说明HT9/sh-2.1-1细胞基因组DNA已经整合了pSilencer 2.1-U6-MDR1重组质粒DNA, HT9/sh-2.1细胞基因组DNA整合了pSilencer 2.1-U6 neo空载体。

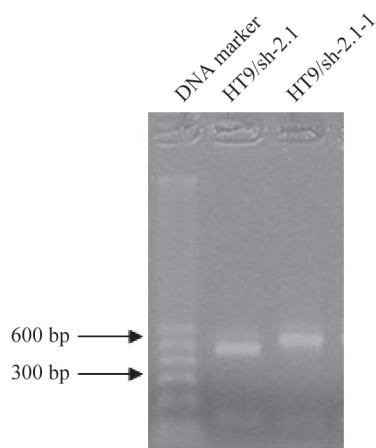
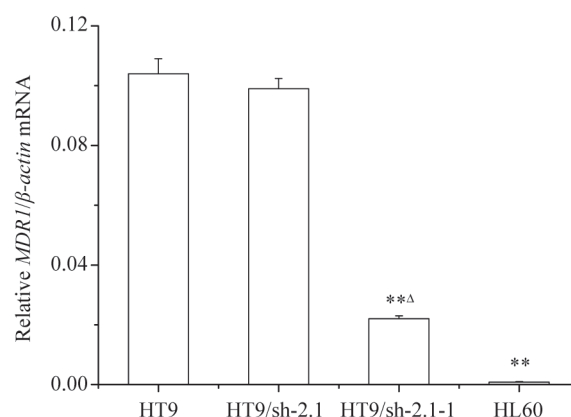


图1 转染细胞基因组DNA PCR扩增产物
Fig.1 The PCR amplification of total DNA of transfected cells

2.2 荧光定量PCR检测MDR1-mRNA的表达

应用定量PCR仪自带数据分析软件获得 C_t , 计算出各组细胞MDR1 mRNA表达值, 用MDR1/ β -actin比值表示mRNA相对表达量。结果显示, HT9/sh-2.1-1细胞的mRNA相对表达量明显低于HT9细胞、



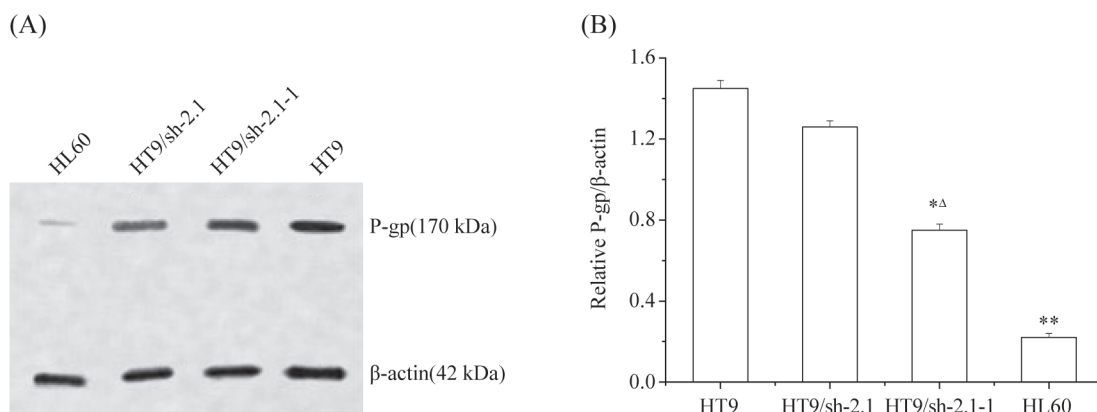
$\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, 与HT9或HT9/sh-2.1细胞比较; $\Delta P<0.05$, 与HL60细胞比较。
 $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$ compared with HT9 or HT9/sh-2.1 cells; $\Delta P<0.05$ compared with HL60 cells.

图2 各组细胞中MDR1/ β -actin mRNA表达
Fig.2 The expression of MDR1/ β -actin mRNA

HT9/sh-2.1细胞, 与HT9细胞相比, HT9/sh-2.1-1细胞MDR1基因的表达降低了78.84%($P<0.01$), HT9/sh-2.1与HT9细胞的mRNA相对表达量无显著性差异($P>0.05$), HT9/sh-2.1-1与HL60细胞mRNA相对表达量差异显著($P<0.05$)。表明, 重组质粒pSilencer 2.1-U6-MDR1对HT9细胞目的基因MDR1的表达有一定干扰作用, 而空载体对目的基因表达无干扰作用(图2)。

2.3 Western blot检测P-gp蛋白的表达

Western blot检测HT9、HT9/sh-2.1、HT9/sh-2.1-1和HL60细胞内P-gp蛋白水平, 以P-gp/ β -actin比值表示蛋白相对表达量。结果显示, 与HT9细胞相比, HT9/



A: Western blot X光片; B: 分析胶片P-gp/ β -actin灰度值。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与HT9细胞比较; $\Delta P<0.05$, 与HL60细胞比较。

A: Western blot X-ray; B: the grey level of P-gp/ β -actin on X-ray. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with HT9 cells; $\Delta P<0.05$ compared with HL60 cells.

图3 各组细胞中P-gp蛋白表达水平
Fig.3 The expression level of P-gp protein in cells

sh-2.1-1细胞的P-gp蛋白表达降低了48.27%($P<0.05$), HT9/sh-2.1与HT9细胞的蛋白相对表达量无显著性差异($P>0.05$), HT9/sh-2.1-1与HL60细胞蛋白相对表达量差异显著($P<0.05$, 图3)。进一步证实了重组质粒pSilencer 2.1-U6-MDR1对HT9细胞MDR1基因沉默的有效性。

2.4 流式细胞术检测P-gp蛋白外排泵功能

经流式细胞术分析, HT9细胞内荧光强度显著低于HL60细胞($P<0.01$), 证实HT9细胞是高度耐药的白血病细胞。与HT9细胞相比, HT9/sh-2.1-1细胞的Rho123荧光强度显著增强($P<0.01$), 而HT9/sh-2.1细胞内Rho123荧光强度无显著差异($P>0.05$), HT9/sh-2.1-1与HL60细胞内荧光强度仍有显著性差异($P<0.01$, 表1)。表明转染后的单克隆细胞HT9/sh-2.1-1的P-gp蛋白外排泵功能有所增强。

2.5 MTT检测各组细胞对三尖杉酯碱、阿霉素的敏感性

表1 各组细胞内Rho123的相对荧光强度($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 1 Accumulation of Rho123 in cells($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

细胞株 Cell line	Rho123相对荧光强度(%) Rho123 fluorescene intensity(%)
HT9	10.80±0.58
HT9/sh-2.1	10.44±0.45
HT9/sh-2.1-1	73.56±1.37** ^{AA}
HL60	95.13±1.12**

** $P<0.01$, 与HT9细胞比较; ^{AA} $P<0.01$, 与HL60细胞比较。

** $P<0.01$ compared with HT9 cells; ^{AA} $P<0.01$ compared with HL60 cells.

HT9与HL60细胞的IC₅₀值差异显著, 进一步说明了HT9细胞的高度耐药性。随着阿霉素、三尖杉酯碱药物浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低, 其中HT9/sh-2.1-1细胞降低最为明显。与HT9细胞相比, 稳定表达阳性单克隆细胞HT9/sh-2.1-1抗肿瘤药的IC₅₀显著降低($P<0.01$), 而HT9/sh-2.1细胞IC₅₀无显著性差异($P>0.05$), HT9/sh-2.1-1与HL60细胞的IC₅₀差异显著($P<0.01$)。耐药相对逆转率见表2。

表2 各组细胞对三尖杉酯碱和阿霉素的敏感性($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Sensitivity of cells to harringtonine and doxorubicin($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

细胞株 Cell line	三尖杉酯碱($\mu\text{mol/L}$) Harringtonine($\mu\text{mol/L}$)	阿霉素($\mu\text{mol/L}$) Doxorubicin($\mu\text{mol/L}$)	三尖杉酯碱逆转率(%) Harringtonine reversal rate(%)	阿霉素逆转率(%) Doxorubicin reversal rate(%)
HT9	2.06±0.15	4.04±0.17	—	—
HT9/sh-2.1	2.12±0.06	4.01±0.04	2.94±0.12	0.75±0.18
HT9/sh-2.1-1	0.57±0.01** ^{AA}	1.56±0.05** ^{AA}	73.14±1.86	62.15±1.59
HL60	0.023±0.02**	0.05±0.01**	—	—

** $P<0.01$, 与HT9细胞比较; ^{AA} $P<0.01$, 与HL60细胞比较。

** $P<0.01$ compared with HT9 cells; ^{AA} $P<0.01$, compared with HL60 cells.

3 讨论

目前, 随着化疗方案的改进和新药的使用^[8], 白血病治疗效果越来越好, 但仍有部分患者在化疗前后对某些药物产生原发或继发性耐药, 从而影响化疗效果。随着耐药机制研究的一步步深入, 各种耐药逆转剂也不断涌现, 国内外学者已将RNA干扰应用于耐药机制及耐药逆转相关领域的研究, Yague等^[9]将设计的两对pSUPER-shRNA质粒表达载体转染白血病耐药细胞K562/ADR后, MDR1基因表达抑制率达95%和97%, 细胞对药物的敏感性恢复至与K562细胞几乎相同的水平。Pichler等^[10]针对MDR1基因构建的8个pGEM3-mdrl1重组载体转染人结肠癌耐药细胞HCT-8和HEK293, 其中有两个干扰片段对MDR1基因抑制率达到90%。通过RNA干扰技术

高效、特异地阻断体内特定基因表达, 促使RNA降解, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型技术, 具备良好的实际应用前景。

本研究成功构建了pSilencer 2.1-U6 neo-MDR1重组质粒, 该质粒转染细胞后整合到细胞染色体上, 随着染色体的复制而复制, 并通过细胞分裂传递到子代, 此稳定转染的细胞为构建维持长期有效的基因沉默细胞模型奠定了基础。经荧光定量PCR和Western blot检测, 与HT9细胞相比, 单克隆细胞HT9/sh-2.1-1的MDR1基因表达降低了78.84%($P<0.01$), P-gp蛋白表达降低了48.27%($P<0.05$), 本实验设计的干扰片段成功沉默了MDR1基因的表达。经流式细胞术检测, 转染前后HT9细胞内荧光强度由(10.8±0.58)%增强到(73.56±1.37)%。因Rho-123是多药抗性细胞P-gp

蛋白的底物, P-gp能利用ATP水解释放的能量将其排出细胞, HT9/sh-2.1-1细胞内Rho-123荧光强度的增强反映出该细胞药物外排功能减弱。转染前后, HT9细胞经三尖杉酯碱处理的 IC_{50} 由 $(2.06\pm0.15) \mu\text{mol/L}$ 降至 $(0.57\pm0.01) \mu\text{mol/L}$, 耐药相对逆转率为73.14%, HT9细胞经阿霉素碱处理的 IC_{50} 由 $(4.04\pm0.17) \mu\text{mol/L}$ 降至 $(1.56\pm0.05) \mu\text{mol/L}$, 耐药相对逆转率为62.15%。综上所述, 本研究设计合成的干扰序列能有效地抑制MDR1基因编码蛋白的表达和功能, 提高耐药细胞对药物的敏感性。本课题为RNA干扰技术逆转白血病细胞耐药并联合化疗治疗新策略提供理论基础。

参考文献 (References)

- 1 常宏宇, 潘凯丽. 白血病多药耐药逆转研究进展. 细胞与分子免疫学杂志(Chang Hongyu, Pan Kaili. The research development of multidrug resistance of leukemia. Chin J Cellul Mol Immunol) 2005; 21: 101-3.
- 2 Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1(P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. Clin Pharmacol Ther 2004; 75(1): 13-20.
- 3 Rumpold H, Wolf AM, Wolf D. The role of P-glycoprotein in imatinib resistance. Leukemia 2006; 20(1): 144-85.
- 4 Fojo T, Bates S. Strategies for reversing drug resistance. Oncogene 2003; 22: 7512-23.
- 5 Alla G. RNAi mechanisms in caenorhabditis elegans. FEBS Lett 2005; 579: 5932-7.
- 6 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 2001; 15(2): 188-12.
- 7 邵淑丽, 崔婷婷, 贾红双, 谢振丽, 张伟伟, 刘 迁, 等. 靶向MDR1基因的RNAi稳定逆转A549/DDP细胞多药耐药. 中国病理生理杂志(Shao Shuli, Cui Tingting, Jia Hongshuang, Xie Zhenli, Zhang Weiwei, Liu Qian, et al. Stable reversal of multidrug resistance in A549/DDP cells by shRNA targeting MDR1 gene. Chin J Pathophysiol) 2011; 27(12): 2265-9.
- 8 高丽萍, 魏虎来, 景 涛, 吴勇杰, 陈 静, 孙 静, 等. siRNA抑制K562/ADM细胞mdr1基因表达并逆转其耐药性. 中国癌症杂志(Gao Liping, Wei Hulai, Jing Tao, Wu Yongjie, Chen Jing, Sun Jing, et al. siRNA silence expression of mdr1 gene and its role in reversing drug-resistance in K562/ADM cells. Chin Oncol) 2007; 17(1): 58-61.
- 9 Yague E, Higgins CF, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. Gene Therapy 2004; 11: 1170-4.
- 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 Jun; 11(12): 4487-94.

Effect of RNAi Silencing MDR1 Gene on the Sensitivity of Multidrug Resistant Acute Promyelocytic Leukemia Cells HT9 to Drugs

Shao Shuli*, Li Xuyan, Zhang Weiwei, Yun Dongze, Fu Bo, Zhang Zhenzhu

(College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract The study investigated the effects of RNAi silencing MDR1 gene, increase the sensitivity of multidrug resistant acute promyelocytic leukemia cells HT9 to harringtonine and doxorubicin. One short hairpin RNA (small hairpin RNA, shRNA) was designed and constructed into pSilencer2.1-U6 neo plasmid. MDR1 shRNA expression plasmid pSilencer 2.1-U6 neo-MDR1 was constructed and introduced into HT9 cells. MDR1 mRNA was assayed by real-time fluorescent quantitative PCR. The P-gp protein was assayed by Western blot. The pump function of P-gp was assayed by FCM. The sensitivity of cells to drugs were assayed by MTT. The results suggested that pSilencer 2.1-U6 neo-MDR1 expression plasmid was constructed successfully. The results of PCR showed that the shRNA recombinant plasmid had integrated into genome. In HT9/sh-2.1-1 cells, MDR1 mRNA were decreased by 78.84% ($P<0.01$), and P-gp protein were decreased by 48.27% ($P<0.05$); The Rho123 were increased from $(10.80\pm0.58)\%$ to $(73.56\pm1.37)\%$; The sensitivity of transfected cells to harringtonine and doxorubicin were increased significantly, IC_{50} were decreased from $(2.06\pm0.15) \mu\text{mol/L}$ to $(0.57\pm0.01) \mu\text{mol/L}$, $(4.04\pm0.17) \mu\text{mol/L}$ to $(1.56\pm0.05) \mu\text{mol/L}$, respectively. So shRNA expression plasmid pSilencer 2.1-U6 neo-MDR1 can permanently inhibit the expression of MDR1 gene stability, and increase the sensitivity of HT9 cells to harringtonine and doxorubicin.

Key words shRNA; MDR1 gene; HT9 cells; harringtonine; doxorubicin

Received: May 17, 2012 Accepted: July 11, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No.C200624) and the Project of Science and Technology of Heilongjiang Provincial Educational Department (No.11511447, No.12511611)

*Corresponding author. Tel: 86-452-2738219; E-mail: shshl32@163.com