

RNA 干扰技术在药物转运体研究中的应用

孔令雷, 李 桦

(军事医学科学院毒物药物研究所药物代谢实验室 抗毒药和毒理学国家重点实验室, 北京 100850)

摘要: RNA 干扰是一种利用双链 RNA 分子特异的沉默靶基因表达的技术, 目前已广泛用于基础生物医学研究。作为一种高选择性和有效的基因调控手段, 这一技术也已用于临床疾病的治疗研究和药物转运体的研究。药物转运体是一类细胞膜蛋白, 在药物的吸收、分布和排泄中发挥重要作用。转运体功能的抑制或缺失将改变药物的清除和药代动力学, 导致药效降低或毒性增加。因此, 在新药研发以及药物临床应用中, 研究药物转运体在药物跨膜转运、组织分布、排泄清除和药-药相互作用中的作用, 对于药物的有效安全使用, 具有重要意义。RNA 干扰技术在药物转运体介导的药物转运和药-药相互作用研究方面, 具有明显的优势。本文对近年来 RNA 干扰技术在药物转运体研究中的应用进行综述, 重点阐述这一技术在药物转运体介导的肿瘤耐药、药物体内转运、清除和相互作用研究中的应用, 为药物转运体的功能和调节研究提供参考。

关键词: RNA 干扰; 药物转运体; 抗药性, 肿瘤; 药物相互作用; 受体, 胞质和核

中图分类号: R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2014)06-0939-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2014.06.018

药物转运体是一类位于细胞膜、能将药物摄取或排出细胞的蛋白或多肽, 广泛分布于体内多种器官和组织, 如肝、肠、肾和脑等, 通过影响药物的吸收、分布和排泄进而影响药物的效应或安全性, 并导致药物相互作用^[1]。转运体通过调控药物在肠上皮细胞、肝细胞或肾小管上皮细胞的进出而影响药物在小肠的吸收以及在肝和肾的消除。此外, 转运体也能限制或促进药物在脑、胎盘、肿瘤等生理屏障或细胞的通透。转运体功能的抑制或缺失将改变药物在组织中的暴露, 导致药效降低或毒性增加。为此, 在新药研发以及药物的临床应用中, 研究药物转运体在候选药物或临床药物跨膜转运、组织分布、排泄清除和药物相互作用中的作用, 对于药物有效安全使用, 具有重要的意义^[2]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是 21 世纪初发现的一种有效的基因调节方法, 并在基础生物医学研究领域得到了广泛应用和快速发展。例如, 研究基因功能, 用于基因治疗以及肿瘤治疗等^[3]。目前, 多数药物转运体的基因已经被鉴别

和克隆, 而 RNAi 技术也已用于转运体的研究中^[2,4]。与传统的基因敲除方法相比, RNAi 是可逆的, 使得其能通过可逆性抑制作用研究转运体的体内功能, 或者用于促进有利于药物临床应用的体内处置; 再者, RNAi 能特异性地抑制靶基因的表达, 避免化学抑制剂因转运蛋白基因之间具有高度的同源性而导致的非特异性, 在药物体内处置和药物相互作用研究中, 具有良好的应用前景。本文将对近年来 RNAi 技术在药物转运体研究中的应用进行综述, 重点总结这一技术在药物转运体介导的肿瘤耐药、药物体内转运、清除和相互作用研究中的应用, 为药物转运体的功能和调节研究提供参考。

1 药物转运体

已知的药物转运体分为两类: ATP-结合盒转运体 (ATP-binding cassette, ABC) 和溶质载体 (solute carrier, SLC)^[5]。ABC 类转运体主要通过 ATP 供能介导细胞对药物的外排, 与药物外排转运相关的转运体主要有 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp), 多药耐药相关蛋白 (multi-drug resistance-associated protein, MRP) 和乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 等。SLC 类转运体主要介导细胞对药物的摄取, 包括有机阴离子转运体 (organic anion transporter, OAT)、有机阴离子转运多肽 (organic anion transport polypeptides, OATP)、有机阳离子转运体 (organic cation transporter, OCT)

基金项目: 国家自然科学基金 (81302760); 中国博士后基金 (2013M542510); 国家科技重大专项 (2008ZXJ09006001); 国家科技重大专项 (2012ZX09301003-001)

作者简介: 孔令雷 (1982-), 男, 博士后, 主要从事神经药理及药物代谢研究。

通讯作者: 李 桦, Tel: (010) 66930664, E-mail: amms_hli@126.com

等^[6]。摄取和外排转运体通过动态的相互作用共同调节细胞内药物或内源性物质的蓄积和转运。

药物转运体具有多样性和复杂性,药物转运体家族存在多个亚家族和亚型,如 ABCC 亚家族包括 12 种亚型(ABCC1~ABCC12),这些转运体亚型之间有大量重叠的底物,而有些重叠的底物也是药物代谢酶的诱导剂或抑制剂。因此,在缺少药物基因组学信息的情况下,很难确定不同转运体在药物转运分布及药物相互作用中的作用。

2 RNA 干扰技术

RNAi 是由双链 RNA 介导的序列特异的基因沉默现象,它在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达,具有高效性和高特异性的特点^[7]。RNAi 不仅已广泛用于基因功能研究,作为一种高选择性和有效性的治疗方法也已经用于临床研究^[3]。RNAi 通过内源性微小 RNA(miRNA)或外源性的小干扰 RNA(siRNA)或短发夹 RNA(shRNA)发挥作用。化学合成的 siRNA 应用简单方便,但由于缺少细胞内的放大机制,只能对靶基因产生暂时的抑制作用,其有效性取决于靶序列、转染方式和靶蛋白的半衰期。载体或病毒介导的 shRNA 主要由生物化学和基因的方法合成,通过质粒或病毒载体进入细胞后能够对靶基因产生长效稳定的抑制作用,其有效性取决于 shRNA 的优化、载体的选择以及有效的传递方式^[8]。miRNA 是一种高度保守的小的非编码 RNA,由接近 20~25 nt 的单链 RNA 分子组成,能够在转录后水平对靶基因

进行调节,对细胞生理和病理功能发挥重要作用。目前,siRNA, shRNA 和 miRNA 均已在药物转运体研究得到应用。

3 RNA 干扰技术逆转药物转运体相关的肿瘤耐药

耐药性是导致肿瘤和其他疾病治疗失败的主要原因之一。耐药性产生的主要机制包括细胞内可溶性药物吸收的减少、细胞内遗传和表型的改变以及疏水性药物通过细胞表面转运体外排的增加^[9]。其中,外排转运体介导的药物外排所致的耐药性发生,是目前研究的热点。外排转运体 P-gp, MRP 和 BCRP 的表达上调是耐药性产生的主要机制,已成为肿瘤化学治疗的主要障碍^[10-11]。通过抑制药物转运体的表达和功能,可增加耐药细胞的药物暴露,是目前逆转药物耐受的主要手段之一。但是,临床上应用化学抑制剂克服肿瘤耐药的疗效有限,且会引起严重的毒性反应^[12]。而 RNAi 技术能特异性地抑制转运体基因的表达和功能,提高化学治疗效果,降低因化学抑制剂带来的风险,为逆转肿瘤耐药提供了新的思路和方法。

近期的研究表明,针对外排转运体的 siRNA 实验研究,展示了该技术能显著抑制肿瘤细胞的转运体表达和功能,成功逆转肿瘤耐药,提高化学治疗的效果。表 1 汇总了 RNAi 技术在药物耐药性研究中的应用文献。多柔比星和表柔比星均属阿霉素类药物,能够有效地治疗多种恶性肿瘤。研究发现,应用 MDR1 的 siRNA 能够抑制耐多柔比星的 MCF-7

表 1 RNA 干扰技术在逆转耐药性研究中的应用

| 转运体 | 细胞/动物 | RNAi | 载体 | 方法 | 文献 |
|-----------|-----------------|---------------|-------|-------|------|
| MDR1 | MaTu/ADR/小鼠 | siRNA/shRNA | 质粒 | 体外/在体 | [20] |
| MDR1a/1b | Colon26/小鼠 | siRNA | 质粒 | 体外/在体 | [17] |
| MDR1a/1b | RLS40/小鼠 | siRNA | 无 | 体外/在体 | [18] |
| MDR1 | BALB/c 小鼠 | Stealth™/RNAi | 无 | 在体 | [21] |
| MDR1 | NCr nu/nu 小鼠 | shRNA | 质粒 | 在体 | [16] |
| MDR1a/1b | 大鼠滑膜细胞 | siRNA | 无 | 体外/在体 | [19] |
| MDR1 | HepG2/mdr1 细胞 | shRNA | 质粒 | 体外/在体 | [22] |
| MDR1 | MCF-7 细胞 | siRNA | 无 | 体外 | [14] |
| MDR1 | JC 细胞/BALB/c 小鼠 | siRNA | 纳米颗粒 | 体外/在体 | [23] |
| MRP1/MRP2 | C57BL/6 小鼠 | shRNA | 腺相关病毒 | 在体 | [24] |
| MRP2 | A2780/cp70 细胞 | shRNA | 质粒 | 体外 | [25] |
| MRP2 | NPC 细胞 | shRNA | 慢病毒 | 体外 | [26] |
| MDR1 | HeLa 细胞 | siRNA | 量子点 | 体外 | [27] |
| MDR1/CRP | MCF-7 细胞 | siRNA | 纳米颗粒 | 体外 | [28] |

MDR: 多药耐药; MRP: 多药耐药相关蛋白; BCRP: 乳腺癌耐药蛋白。

乳腺癌细胞中 MDR1 的蛋白表达,恢复多柔比星在细胞内的累积和分布,提高耐药细胞对多柔比星的化学敏感性^[13-14]。在多种人肿瘤细胞系中,MRP1 的 siRNA 能够明显抑制 MRP1 mRNA 和蛋白的表达,提高表柔比星对肿瘤细胞的有效性^[15]。Pichler 等^[16]用生物素发光的方法发现, RNAi 技术能够分别有效抑制 MDR1 在肿瘤细胞、小鼠肿瘤组织以及肝的表达和功能,说明 RNAi 技术在体内逆转 MDR1 的可行性。Patutina 和 Matsui^[17-18]两课题组分别通过特异的 *mdr1a/1b* siRNA,同时抑制 *mdr1a/1b* 在小鼠体内的表达,提高了化学治疗的敏感性。此外, Honjo 等^[19]报道应用 siRNA 能够有效抑制成纤维样滑膜细胞和大鼠滑膜中的 P-gp 表达,提高地塞米松的抗炎作用,改善类风湿性关节炎的治疗。RNAi 作为一种高效的序列特异性的基因敲除技术,在多基因调控的耐药治疗领域取得了迅速发展,展现了很好的应用前景。

4 RNA 干扰技术在药物处置研究中的应用

转运体通过调控药物在肠上皮细胞、肝细胞和肾小管上皮细胞的摄取和外排,影响药物在小肠的吸收以及在肝和肾的消除;转运体也能调控药物在脑、胎盘、肿瘤和 T 细胞等的通透性,影响药物在这些组织器官或细胞的分布,从而改变药物在体内的处置行为。鉴别药物是否是转运体的底物、抑制剂或诱导剂,以及评价不同转运体在某个药物处置中的作用,是转运体介导的药物处置研究中首先要解决的问题。转运体底物的鉴别多用化学抑制剂或重组的表达系统来进行。由于化学抑制剂多存在非特异性和底物交叉性,并不能真实反映转运体在底物转运中的作用。另外,重组表达系统如转染 Madin-Darby 犬肾细胞 (MDCK)-MDR1 等虽然能够特异性地鉴别某种转运体的底物,但由于转运体数量众多,且构建重组系统需要较长时间,限制了重组系统的应用^[29]。基因敲除动物模型在体内基因功能的研究中发挥了重要的作用。经典的敲除方法主要通过破坏靶基因结构如内源性序列的缺失,外源性序列的插入来完成的。基于 RNAi 的特异性及其不改变基因组结构的特点, RNAi 技术已成为建立功能缺失细胞和动物模型的一种新方法,对于转运体功能研究和底物鉴别也是一种非常有效的技术,表 2 汇总的文献研究表明,该技术已经广泛用于这一目的。

Caco-2 单层细胞表达有多种外排转运体,主要用于药物的双向转运研究。Darnell 等^[30]将慢病毒介导的 P-gp 和 MRP2 的 shRNA 导入 Caco-2 细胞

表 2 RNA 干扰技术在转运体功能和底物鉴别中的应用

| 转运体 | 细胞/动物 | RNAi | 载体 | 方法 | 文献 |
|------|--------------|-------|-------|----|------|
| OATP | 人肝细胞 | siRNA | 无 | 体外 | [33] |
| BCRP | 大鼠肝细胞 | shRNA | 腺病毒 | 体外 | [37] |
| BCRP | 大鼠肝细胞 | shRNA | 腺病毒 | 体外 | [35] |
| MRP2 | 大鼠肝细胞 | siRNA | 无 | 体外 | [38] |
| MRP3 | Caco-2 细胞 | siRNA | 质粒 | 体外 | [39] |
| MDR1 | Caco-2 细胞 | shRNA | 慢病毒 | 体外 | [30] |
| MRP2 | Caco-2 细胞 | shRNA | 慢病毒 | 体外 | [31] |
| MDR1 | Caco-2 细胞 | siRNA | 无 | 体外 | [40] |
| MRP2 | 大鼠肝细胞 | shRNA | 腺病毒 | 体外 | [41] |
| BCRP | BCRP-MDCK 细胞 | siRNA | 聚乙烯亚胺 | 体外 | [42] |
| MRP2 | WH 大鼠 | siRNA | 无 | 在体 | [36] |
| MRP4 | | | | | |

OATP: 有机阴离子转运多肽。

中,研究了 P-gp 和 MRP2 在抗凝血药希美加群 (ximelagatran) 排泄中的作用。他们发现,是 P-gp 而不是 MRP2 参与了希美加群、羟基美拉加群和美拉加群的转运。Li 等^[31]采用慢病毒介导的 P-gp, MRP2 和 BCRP 的 shRNA,在 Caco-2 细胞上研究了他汀类药物的外排作用,结果发现阿托伐他汀、氟伐他汀和罗舒伐他汀由 P-gp、BCRP 和 MRP2 介导外排转运,而洛伐他汀和辛伐他汀的转运则不通过 P-gp, BCRP 和 MRP2 的介导。上述研究表明,将 RNAi 技术与 Caco-2 细胞模型相结合,为药物和转运体相互作用的研究提供了一个有效工具,在 RNAi 的 Caco-2 细胞上,可以评价特定转运体在药物跨膜转运中的作用,并预测潜在的药物相互作用。

原代培养肝细胞表达 I 相和 II 相代谢酶以及多种转运体,与生理环境接近,已广泛用于转运体介导的药物肝摄取、代谢和胆汁排泄研究,并可准确地预测肝胆药物分布^[32]。Liao 等^[33]将 OATP1B1, 1B3 和 2B1 的 siRNA 导入三明治培养的人肝细胞中,显著降低肝 OATP 的表达,西立伐他汀的肝摄取由此降低了 20%~30%,其代谢产物的肝摄取也降低 50%。siRNA 干扰肝细胞的结果提示,同时服用 OATP 抑制剂能显著地改变西立伐他汀的药代动力学,引起药物相互作用。

由于人肝细胞的供体较少且价格昂贵,限制了其在药物转运体研究中的应用。三明治培养的大鼠肝细胞由于分离培养相对简单方便,可广泛用于药物肝摄取和胆汁外排的研究^[34]。Yue 等^[35]应用腺病毒介导的 BCRP shRNA,成功敲除大鼠肝细胞的

BCRP,而不影响 P-gp, MRP2, BSEP, MRP4 和 OATP1A1 的表达。应用这一 BCRP 敲除模型评价呋喃妥因的肝处置发现,呋喃妥因的肝细胞内浓度显著增加,而呋喃妥因的胆管外排指数和体外胆汁清除率分别降至对照组的 11%和 14%,表明呋喃妥因的胆汁排泄主要由 BCRP 介导,与 BCRP 抑制剂或诱导剂同时服用,可能引起药物相互作用。

现有文献报道已经证实,siRNA 在体外细胞模型上的特异性和有效性,应用 siRNA 评价体内转运体对药物处置的作用及调节成为下一个研究热点,但目前的文献报道较少。van de Water 等^[36]通过静脉注射放射性标记的 siRNA 观察其生物学分布发现,siRNA 主要聚集在肾并经尿排泄。注射 1 h 后,肾中的 siRNA 含量比其他组织高 40 倍。除此之外,该研究还通过注射 MRP2 siRNA,观察了肾近曲小管中 MRP2 的功能。注射 MRP2 siRNA 4 d 后,尿中的钙黄绿素排泄率显著下降。而 MRP4 siRNA 不能改变钙黄绿素的排泄。因此,siRNA 为研究肾转运体的功能提供了新的方法。

5 RNA 干扰技术在核受体调节药物转运体研究中的应用

鉴于药物转运体在药物的吸收、分布和排泄中发挥的重要作用,其表达和功能的调节对于药物的有效和安全应用具有重要意义。转运体的表达和功能主要受到核受体调控^[43-44],后者通过调节药物转运体基因的表达进而对内源性和外源性物质的转运产生重大影响,导致不可预知的药物相互作用的发生。核受体家族主要包括孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR)、组成型雄烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 和芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) 等,广泛参与药物转运体的调节^[45-46]。表 3 总结了 RNAi 技术在核受体调控药物转运体研究中的部分应用。

PXR 和 CAR 是调节药物代谢酶和转运体的主要核受体,在多种癌细胞中的表达增高,如前列腺癌、乳腺癌、肠癌、结肠癌和子宫内膜癌等,对 I 相及 II 相代谢酶和外排转运体的基因转录调节发挥重要作用。因此,PXR 和 CAR 与肿瘤的耐药性密切相关,RNAi 通过抑制核受体的激活使转运体的表达下调,从而逆转肿瘤耐药性^[47]。PXR 是调节药物代谢酶和转运体基因的最重要的核受体,在许多组织和细胞中表达,包括肝细胞、肠细胞、淋巴细胞、内皮细胞和血脑屏障等。PXR 的激活能调节多种转运体,包括 P-gp, MRP2, BCRP 和 OATP 等。

表 3 RNA 干扰技术在核受体调节药物转运体研究中的应用

| 核受体 | 体系 | RNAi 方法 | 目标基因 | 文献 |
|------------|------------------------|----------|----------------|------|
| PXR | HepG2 细胞 | siRNA 体外 | P-gp MRP2 | [48] |
| AHR | LS174T 细胞 | siRNA 体外 | BCRP | [54] |
| PXR | MCF-7/HeLa HepG2 细胞 | siRNA 体外 | OATP1A2 | [55] |
| PXR | 人 RPE 细胞 | siRNA 体外 | P-gp | [56] |
| PXR CAR | hCMEC/D3 | siRNA 体外 | P-gp | [57] |
| PXR | HepG2 细胞 | siRNA 体外 | P-gp | [49] |
| CAR | 卵巢癌细胞 | siRNA 体外 | MDR1 UGT1A1 | [52] |

PXR: 孕烷受体; CAR: 组成型雄烷受体。

Rigalli 等^[48]研究了抗南美锥虫药苄硝唑对 ABC 转运体和代谢酶的调节作用发现,苄硝唑能增加 P-gp 和 MRP2 的蛋白表达,而给予 PXR siRNA 后则完全逆转 P-gp 和 MRP2 的上调;随后他们用报告基因法发现,苄硝唑能激活 PXR,应用 P-gp siRNA 证实了 P-gp 参与了苄硝唑的转运。这些结果表明,苄硝唑通过激活 PXR 使 P-gp 的表达上调,进而增加了其自身的外排。利尿药螺内酯同样可以诱导 P-gp 的表达,给予 PXR 的 siRNA 可使 PXR 的蛋白水平降低 74%,并完全逆转螺内酯对 P-gp 的诱导作用^[49]。这些研究结果提示,PXR 的配体药物通过激活 PXR 诱导 P-gp 的表达,使 P-gp 底物的自身转运和代谢等药代动力学行为发生改变,从而影响其有效性和安全性。

CAR 功能与 PXR 相似,能识别许多结构不同的化合物,如雄甾烷代谢产物、胆酸等。最近的研究表明,CAR 调节的基因与 PXR 存在很大重叠性,如 CYP 酶、II 相酶、胆酸和药物转运体等^[50-51]。CAR 主要分布在肝、肾、小肠、脑和睾丸等组织。CAR 激动剂 CITCO 能够上调卵巢癌细胞中 MDR1 和 UGT1A1 的表达,CAR 的 siRNA 能下调 MDR1 和 UGT1A1 的表达,同时促进抗癌药物引起的细胞生长抑制和凋亡,提高卵巢癌的化疗^[52]。

肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 属于核激素受体超家族,分为 LXR α 和 LXR β 。LXR β 在全身分布广泛,LXR α 则主要分布于肝、肾、小肠和脂肪组织。LXR 激动剂 TO901317 能诱导肝 MRP2 的表达,但对 MDR1 和 BCRP 没有影响,给予 LXR α 的 siRNA 能阻断 MRP2 的表达,表明 LXR 参与了 MRP2 的调控,可能会影响药物的胆汁排泄^[53]。因此,应用 RNAi 技术不仅有助于了解核受体对靶基因调控的作用,还可以对药物转运的潜在作用有更

深的理解。

6 展望

目前,已发现的药物转运体超过 400 种,多数转运体已经被克隆和鉴别。面对如此众多的转运体,鉴别其在药物转运中的功能并用于疾病的治疗,成为研究的热点。RNAi 技术将大大促进对这些转运体基因功能的研究,与传统的基敲除技术相比, RNAi 技术具有投入少,周期短,操作简单等优势。随着对 RNAi 机制研究的不断深入, RNAi 技术将成为研究药物转运体基因功能不可或缺的工具。此外,随着药物转运体基因功能的阐明,在临床上应用特异干扰 RNA 与化学药物联合治疗可以提高药物的疗效,避免药物不良反应。

虽然 RNAi 技术以其特异性和高效性在生物学领域中迅速发展,取得许多令人振奋的研究成果,但仍有下列问题需要解决。① siRNA 的有效性。siRNA 的有效性受多种因素的影响,包括靶序列,有效的传递系统以及靶蛋白的半衰期。目前, siRNA 的设计方法已经取得很大进展,但有效 siRNA 序列的选择仍然是一个技术难题, siRNA 的有效性需要反复进行实验筛选。哺乳动物细胞内缺少 RNAi 扩增机制, siRNA 分子或表达载体能否进入每一个靶细胞是基因敲除成功的关键。但是由于转染细胞的类型不同以及转染试剂的毒性使转染过程的优化比较困难。药物转运体通常具有较长的半衰期,转染后观察到蛋白敲除和功能改变需要较长的时间。此外,影响 siRNA 有效性的另一个主要问题是脱靶效应即非靶基因的抑制,导致 siRNA 非特异性的发生^[58]。② siRNA 的传递系统。siRNA 的大小及其所带的负电荷使其很难穿过细胞膜,因此应用中最重要的一步是将 siRNA 有效传递进入靶细胞。目前,脂质体、纳米材料等已经成功的用于 siRNA 的传递,但是尚未从根本上解决问题^[59]。③ 毒性反应。siRNA 或 shRNA 的导入可能激活体内干扰素反应基因,非特异性地全面抑制内源性 mRNA 的翻译,并导致细胞凋亡。另外,双链 RNA 通过与 RNA 结合蛋白相互作用也能够引起自身免疫反应^[60]。虽然 RNAi 技术还存在以上问题,但随着 RNAi 机制的逐渐阐明,这些问题将有望得到解决。

总之, RNAi 技术被认为是基因治疗,转运体功能研究和药物研发中的一项革命性方法。目前, RNAi 已经成功用于逆转转运体介导的肿瘤耐药性、转运体功能和底物鉴别研究和药物基于转运体的相互作用研究。RNAi 技术的特异性和有效性使

之成为研究药物转运体的有效工具,将有望在药物代谢、肿瘤治疗等方面发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Kusuvara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney[J]. *J Control Release*, 2002, **78** (1-3):43-54.
- [2] Yu AM. Small interfering RNA in drug metabolism and transport[J]. *Curr Drug Metab*, 2007, **8**(7): 700-708.
- [3] Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications[J]. *Trends Biotechnol*, 2010, **28**(11): 570-579.
- [4] Abbasi M, Lavasanifar A, Uludag H. Recent attempts at RNAi-mediated P-glycoprotein down-regulation for reversal of multidrug resistance in cancer[J]. *Med Res Rev*, 2013, **33**(1):33-53.
- [5] Keogh JP. Membrane transporters in drug development[J]. *Adv Pharmacol*, 2012, **63**:1-42.
- [6] Yoshida K, Maeda K, Sugiyama Y. Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, **53**:581-612.
- [7] Lee SH, Sinko PJ. siRNA-getting the message out[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, **27**(5):401-410.
- [8] Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, **59**(2-3):75-86.
- [9] Kerbel RS. Molecular and physiologic mechanisms of drug resistance in cancer: an overview [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2001, **20**(1-2):1-2.
- [10] Zhang Q, Li F. Combating P-glycoprotein-mediated multidrug resistance using therapeutic nanoparticles [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, **19**(37): 6655-6666.
- [11] Li H, Yang BB. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, **34**(7):870-879.
- [12] Liang XJ, Chen C, Zhao Y, Wang PC. Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, **596**:467-488.
- [13] Chen Y, Bathula SR, Li J, Huang L. Multifunctional nanoparticles delivering small interfering RNA and doxorubicin overcome drug resistance in cancer[J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(29):22639-22650.

- [14] Dönmez Y, Gündüz U. Reversal of multidrug resistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2011, **65**(2):85-89.
- [15] Wu Z, Li X, Zeng Y, Zhuang X, Shen H, Zhu H, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibition of MRP gene expression and reversal of multidrug resistance by siRNA [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011, **108**(3):177-184.
- [16] Pichler A, Zelcer N, Prior JL, Kuil AJ, Piwnicka-Worms D. *In vivo* RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(12):4487-4494.
- [17] Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. Sequence-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference [J]. *Pharm Res*, 2005, **22**(12):2091-2098.
- [18] Patutina OA, Mironova NL, Popova NA, Kaledin VI, Nikolin VP, Vlassov VV, et al. The siRNA targeted to *mdr1b* and *mdr1a* mRNAs *in vivo* sensitizes murine lymphosarcoma to chemotherapy [J]. *BMC Cancer*, 2010, **10**:204.
- [19] Honjo K, Takahashi KA, Mazda O, Kishida T, Shinya M, Tokunaga D, et al. MDR1a/1b gene silencing enhances drug sensitivity in rat fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Gene Med*, 2010, **12**(2):219-227.
- [20] Stein U, Walther W, Stege A, Kaszubiak A, Fichtner I, Lage H. Complete *in vivo* reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA [J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(1):178-186.
- [21] Xiao H, Wu Z, Shen H, Luo AL, Yang YF, Li XB, et al. *In vivo* reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by efficient delivery of stealth RNAi [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, **103**(4):342-348.
- [22] Abbasi M, Aliabadi HM, Moase EH, Lavasanifar A, Kaur K, Lai R, et al. siRNA-mediated down-regulation of P-glycoprotein in a xenograft tumor model in NOD-SCID mice [J]. *Pharm Res*, 2011, **28**(10):2516-2529.
- [23] Patil YB, Swaminathan SK, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance [J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(2):358-365.
- [24] Borel F, van Logtenstein R, Koornneef A, Maczuga P, Ritsema T, Petry H, et al. *In vivo* knock-down of multidrug resistance transporters ABCC1 and ABCC2 by AAV-delivered shRNAs and by artificial miRNAs [J]. *J RNAi Gene Silencing*, 2011, **7**:434-442.
- [25] Ma JJ, Chen BL, Xin XY. Inhibition of multi-drug resistance of ovarian carcinoma by small interfering RNA targeting to MRP2 gene [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2009, **279**(2):149-157.
- [26] Xie SM, Fang WY, Liu Z, Wang SX, Li X, Liu TF, et al. Lentivirus-mediated RNAi silencing targeting ABCC2 increasing the sensitivity of a human nasopharyngeal carcinoma cell line against cisplatin [J]. *J Transl Med*, 2008, **6**:55.
- [27] Li JM, Wang YY, Zhao MX, Tan CP, Li YQ, Le XY, et al. Multifunctional QD-based co-delivery of siRNA and doxorubicin to HeLa cells for reversal of multidrug resistance and real-time tracking [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(9):2780-2790.
- [28] Li YT, Chua MJ, Kunnath AP, Chowdhury EH. Reversing multidrug resistance in breast cancer cells by silencing ABC transporter genes with nanoparticle-facilitated delivery of target siRNAs [J]. *Int J Nanomed*, 2012, **7**:2473-2481.
- [29] Tian X, Zhang P, Zamek-Gliszczyński MJ, Brouwer KL. Knocking down transport: applications of RNA interference in the study of drug transport proteins [J]. *Drug Metab Rev*, 2005, **37**(4):705-723.
- [30] Darnell M, Karlsson JE, Owen A, Hidalgo IJ, Li J, Zhang W, et al. Investigation of the involvement of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in the efflux of ximelagatran and its metabolites by using short hairpin RNA knockdown in Caco-2 cells [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, **38**(3):491-497.
- [31] Li J, Volpe DA, Wang Y, Zhang W, Bode C, Owen A, et al. Use of transporter knockdown Caco-2 cells to investigate the *in vitro* efflux of statin drugs [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, **39**(7):1196-1202.
- [32] Hewitt NJ, Lechón MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies [J]. *Drug Metab Rev*, 2007, **39**(1):159-234.
- [33] Liao M, Raczyński AR, Chen M, Chuang BC, Zhu Q, Shipman R, et al. Inhibition of hepatic organic anion-transporting polypeptide by RNA interference in sandwich-cultured human hepatocytes: an *in vitro* model to assess transporter-me-

- diated drug-drug interactions [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, **38**(9):1612-1622.
- [34] Swift B, Pfeifer ND, Brouwer KL. Sandwich-cultured hepatocytes: an *in vitro* model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity[J]. *Drug Metab Rev*, 2010, **42**(3):446-471.
- [35] Yue W, Abe K, Brouwer KL. Knocking down breast cancer resistance protein (Bcrp) by adenoviral vector-mediated RNA interference (RNAi) in sandwich-cultured rat hepatocytes: a novel tool to assess the contribution of Bcrp to drug biliary excretion[J]. *Mol Pharm*, 2009, **6**(1):134-143.
- [36] van de Water FM, Boerman OC, Wouterse AC, Peters JG, Russel FG, Masereeuw R. Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, **34**(8):1393-1397.
- [37] Yue W, Lee JK, Abe K, Sugiyama Y, Brouwer KL. Decreased hepatic breast cancer resistance protein expression and function in multidrug resistance-associated protein 2-deficient (TR⁻) rats[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, **39**(3):441-447.
- [38] Tian X, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang P, Brouwer KL. Modulation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and Mrp3 expression and function with small interfering RNA in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, **66**(4):1004-1010.
- [39] Watanabe T, Onuki R, Yamashita S, Taira K, Sugiyama Y. Construction of a functional transporter analysis system using MDR1 knockdown Caco-2 cells[J]. *Pharm Res*, 2005, **22**(8):1287-1293.
- [40] Celius T, Garberg P, Lundgren B. Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **324**(1):365-371.
- [41] Yang K, Pfeifer ND, Hardwick RN, Yue W, Stewart PW, Brouwer KL. An experimental approach to evaluate the impact of impaired transport function on hepatobiliary drug disposition using Mrp2-deficient TR-rat sandwich-cultured hepatocytes in combination with Bcrp knockdown [J]. *Mol Pharm*, 2014, **11**(3):766-775.
- [42] Aliabadi HM, Landry B, Mahdipoor P, Hsu CY, Uludağ H. Effective down-regulation of breast cancer resistance protein (BCRP) by siRNA delivery using lipid-substituted aliphatic polymers [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, **81**(1):33-42.
- [43] Pavék P, Smutný T. Nuclear receptors in regulation of biotransformation enzymes and drug transporters in the placental barrier [J]. *Drug Metab Rev*, 2014, **46**(1):19-32.
- [44] Pavék P, Smutný T. Nuclear receptors in regulation of biotransformation enzymes and drug transporters in the placental barrier [J]. *Drug Metab Rev*, 2014, **46**(1):19-32.
- [45] Chen T. Overcoming drug resistance by regulating nuclear receptors[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, **62**(13):1257-1264.
- [46] Chen Y, Tang Y, Guo C, Wang J, Boral D, Nie D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, **83**(8):1112-1126.
- [47] Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, **32**(1-2):211-227.
- [48] Rigalli JP, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Arias A, Theile D, et al. Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, **6**(12):e1951.
- [49] Rigalli JP, Ruiz ML, Perdomo VG, Villanueva SS, Mottino AD, Catania VA. Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells [J]. *Toxicology*, 2011, **285**(1-2):18-24.
- [50] Chan GN, Hoque MT, Bendayan R. Role of nuclear receptors in the regulation of drug transporters in the brain [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, **34**(7):361-372.
- [51] Wallace BD, Redinbo MR. Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective[J]. *Drug Metab Rev*, 2013, **45**(1):79-100.
- [52] Wang Y, Masuyama H, Nobumoto E, Zhang G, Hiramatsu Y. The inhibition of constitutive androstane receptor-mediated pathway enhances the effects of anticancer agents in ovarian cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, **90**(4):356-366.
- [53] Chisaki I, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1788**(11):2396-2403.
- [54] Tompkins LM, Li H, Li L, Lynch C, Xie Y, Nakanishi

- T, *et al.* A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, **80**(11):1754-1761.
- [55] Meyer zu Schwabedissen HE, Tirona RG, Yip CS, Ho RH, Kim RB. Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(22):9338-9347.
- [56] Zhang Y, Lu M, Sun X, Li C, Kuang X, Ruan X. Expression and activity of p-glycoprotein elevated by dexamethasone in cultured retinal pigment epithelium involve glucocorticoid receptor and pregnane X receptor[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, **53**(7):3508-3515.
- [57] Chan GN, Hoque MT, Cummins CL, Bendayan R. Regulation of P-glycoprotein by orphan nuclear receptors in human brain microvessel endothelial cells[J]. *J Neurochem*, 2011, **118**(2):163-175.
- [58] Rao DD, Senzer N, Cleary MA, Nemunaitis J. Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development[J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, **16**(11):807-809.
- [59] Kesharwani P, Gajbhiye V, Jain NK. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA[J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(29):7138-7150.
- [60] Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, *et al.* Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies[J]. *Gene*, 2014, **538**(2):217-227.

RNA interference technique and its application to drug transporter research

KONG Ling-lei, LI Hua

(State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a powerful technique that utilizes double-stranded RNA molecules to specifically knock down the expression of the targeted gene. The RNAi technique has a broad application to basic biomedical research. Thanks to its high selectivity and effectivity, this technique is also used clinically as a disease intervention and therapeutic method as well as in the research of drug transporters. Drug transporters are membrane proteins that play important roles in the absorption, distribution and elimination of a wide range of drugs. Inhibition or deletion of transporters may affect clearance and pharmacokinetics of drugs and lead to altered toxicity or therapeutic efficacy. Therefore, in drug development and clinical application, it has become critically important to characterize the roles of transporters in transmembrane transport, tissue distribution, clearance of drugs and drug-drug interactions. However, the diversity and complexity of transporters make it difficult to identify and confirm the role of transporters in drug transportation and drug-drug interactions using chemical inhibitors of transporters. RNAi is an excellent method in delineating their specific roles in drug distribution, elimination and drug-drug interactions. This article reviews recent studies using RNAi to silence gene expression of specific transporters and the application to the research of transporters mediated cancer resistance, drug disposition, clearance and drug-drug interactions.

Key words: RNA interference; drug transporter; drug resistance, neoplasm; drug interaction; receptors, cytoplasmic and nuclear

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(81302760); The Chinese Postdoctoral Science Foundation Project (2013M542510); National Science and Technology Major Project of China (2008ZXJ09006001); and National Science and Technology Major Project of China(2012ZX09301003-001)

Corresponding author: LI Hua, Tel: (010)66930664, E-mail: amms_hli@126.com

(收稿日期: 2014-08-18 接受日期: 2014-11-18)

(本文编辑: 乔虹)