

靶向肿瘤多药耐药基因 *mdr1* 的 siRNA 的构建与鉴定

林燕真¹, 张雅丽², 李瑞银², 杨连威², 程 通², 温兰玲^{1,*}

(1. 厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361004; 2. 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心(厦门大学), 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: *mdr1* 基因及其表达产物 P-gp 是引起肿瘤细胞多药耐药(MDR)的主要原因, 抑制 *mdr1* 基因的表达可用于逆转 MDR. RNAi 可用于特异抑制靶基因的表达, 本研究的目的是构建获得可特异有效靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 元件. 应用 siRNA 设计软件与 mRNA 结构分析软件设计构建了 3 个分别靶向 *mdr1* 基因 mRNA 环结构和茎结构的 siRNA 元件, 同时构建了携带 *mdr1* 基因序列的 *luc* 报告质粒, 通过 siRNA 表达质粒与携带靶序列的报告质粒的共转染抑制实验检测不同 siRNA 的抑制效率, 结果显示靶向环结构 siMDR1B 具有较好的抑制效率和特异性. 进一步将 siMDR1B 表达载体与 *mdr1* 基因表达载体共转染细胞, 应用免疫流式细胞术检测显示, 相比对照细胞, siMDR1B 可显著抑制其转染后 *mdr1* 基因产物 P-gp 蛋白的表达活性. 同时采用 CCK-8 细胞活性检测试剂评价了 siMDR1B 对细胞活性的影响, 结果显示 siMDR1B 不会影响细胞活性, 具有良好的特异性. 本研究获得的可有效靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 元件可为进一步开展逆转 MDR 研究提供重要基础.

关键词: *mdr1* 基因; RNA 干扰; siRNA

中图分类号: R 373

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)03-0391-06

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对某一化疗药物产生耐药性后, 对其他化学结构及机理不同的化疗药物也产生交叉耐药的现象. MDR 是导致肿瘤化疗失败的重要原因, 如何逆转 MDR 已成为目前肿瘤化疗研究的热点. 研究已显示, *mdr1* 基因及其表达产物 P-gp 是引起 MDR 的主要原因^[1-2]. P-gp 属于 ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白家族, 可以能量依赖性地将药物泵出细胞外, 使细胞内的药物减少; 还可使细胞内药物再分布, 进一步减少作用靶点部位的药物浓度, 从而导致耐药^[2-3]. RNAi 是近年来迅速发展起来的一种新型的基因表达抑制技术, 已被应用于抗病毒、抗肿瘤及基因功能研究等领域^[4-5], 应用 RNAi 抑制 *mdr1* 基因表达有望成为一种逆转 MDR 的有效方法, 筛选获得具有高效抑制特性的 RNAi 元件是进行相关研究的重要基础. RNAi 具有序列特异性^[6], 靶向同一基因的不同 siRNA 的基因抑制效果各异的原因尚不完全明确, 可能与 siRNA 序列及靶基因 mRNA 序列的一级结构及二级结构有

关^[7]. 有研究显示 siRNA 靶序列所在的茎环结构特征与抑制效率存在关联^[8]. 因此本研究探索通过结合应用 mRNA 结构分析与 siRNA 设计软件设计构建靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 元件, 同时构建携带靶基因序列的 *luc* 报告质粒系统, 通过共转染抑制实验, 特异性分析、脱靶效应分析筛选获得可有效靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 元件, 为进一步应用于逆转 MDR 研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞株

E. coli DH5 α , 293FT 细胞为本实验室保存; pSUPER 质粒购自 Invitrogen 公司, pCMV-*mdr1* 质粒(含 *mdr1* 基因全长序列)购于 Ebioscience 公司; 携带荧光素酶基因(*luc*)的报告质粒 pST-*luc* 由韩家准教授实验室提供; A2780 细胞购于中国典型培养物保藏中心.

1.2 生化试剂

限制性核酸内切酶购自大连宝生物工程技术有限公司; T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司; 质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒为北京天根公司产品; 引物

收稿日期: 2011-06-27

基金项目: 福建省卫生厅青年科研课题计划项目(2008-1-53); 厦门市卫生局基金项目(3502z20089012)

* 通信作者: wenll@126.com

由上海生工生物工程有限公司合成;DMEM 培养基、Opti-MEM、Glutamine、细胞培养用非必需氨基酸购自 Invitrogen 公司;脂质体 sofast 购自太阳马公司;细胞培养用胎牛血清(FBS)购自 HyClone 公司;Dual-Luciferase®双萤光素酶报告基因检测系统购自 Promega 公司;抗体 Phycoerythrin (PE) Anti-Human *mdr1* 购于 eBioscience 公司;Cell Counting Kit-8 试剂(CCK-8 试剂)购自碧云天公司。

1.3 靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 设计与表达载体构建

以 *mdr1* 基因序列(Genbank No. NM000927)为模板序列,利用 Sfold 软件^[9]预测 *mdr1* 基因 mRNA 二级结构,结合 siRNA 设计软件(Therom 在线设计软件 siRNA Designer),设计了 3 个靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 序列,以靶向 HBV 基因的 siB245^[10]作为对照.合成各靶点序列所对应的 siRNA 引物(表 1),分别经退火处理后连接到经 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切处理的 pSUPER 载体,经 *Eco*R I/*Hind* III 小量酶切鉴定后获得系列 siRNA 表达质粒 pSUPER-siRNA.

1.4 报告质粒的构建

通过合成 PCR 引物(表 2)特异性扩增 *mdr1* 基

因靶基因上包含靶点所在位置的约 250 bp 长度的 DNA 序列 MT1、MT2,经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切后回收目的片段,将目的片段与经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切的 pST-luc 载体连接,经酶切鉴定得到分别含不同区段双倍体靶序列的报告质粒 pST-luc-MT1 和 pST-luc-MT2(图 1).

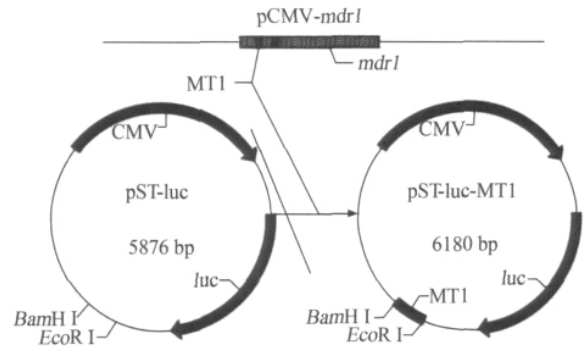


图 1 报告质粒 pST-luc-MT1 构建示意图

Fig. 1 Construction schemes of reporter plasmid pST-luc-MT1

1.5 荧光素酶活性检测

在 24 孔培养板中每孔铺入 2×10^5 个 293FT 细胞,12 h 后换液,将 pSUPER-siRNA 表达质粒与报告

表 1 siRNA 合成的引物序列

Tab. 1 The sequences of primers used for siRNAs construction

名称	引物序列
siMDR1Af	5'-GATCCCCGAAACCAACTGTCAGTGTATTCAAGAGA _t UACACUGACAGUUGGUUUCTTTTTA-3'
siMDR1Ar	5'-AGCTTAAAAAAGAAACCAACTGTCAGUGUATCTCTTGAAUACACUGACAGUUGGUUUCGGG-3'
siMDR1Bf	5'-GATCCCC AGAAAGAACTTGAAAGGTATTCAAGAGATACCTTCAAGTTCTTTCTTTTTTA-3'
siMDR1Br	5'-AGCTTAAAAA AGAAAGAACTTGAAAGGTATCTCTTGAATACCTTCAAGTTCTTTCTGGG-3'
siMDR1Cf	5'-GATCCCCTGACAGATATCTTTGCAAATTCAAGAGATTGCAAAGATATCTGTCATTTTTTA-3'
siMDR1Cr	5'-AGCTTAAAAATGACAGATATCTTTGCAAATCTCTTGAATTTGCAAAGATATCTGTCAGGG-3'
B245-f	5'-GATCCCCAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTTCAAGAGAAGTCCACCACGAGTCTAGACTTTTTTA-3'
B245-r	5'-AGCTTAAAAAAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTTGAAAGTCCACCACGAGTCTAGACTGGG-3'

表 2 报告质粒 PCR 扩增引物序列

Tab. 2 Primer sequences used in PCR for construction of reporter plasmids

名称	引物序列
MT1-f	5'-CCGGAATTCGGGACCGCAATGGAGGAGCAAAG-3'
MT1-r	5'-CGCGGATCCGCGCTCCAGATTCATGAAGAACCC-3'
MT2-f	5'-CCGGAATTCGGAGCTGGAGCAGTAGCTGAAGA-3'
MT2-r	5'-CGCGGATCCGCGGAATACAGTGAGTACTTGTCC-3'

质粒 pST-luc-MT1 或 pST-luc-MT2 混合后以脂质体对细胞进行转染(具体操作过程参照 sofast 试剂操作指南),2 种质粒用量均为 $0.6 \mu\text{g}$, 转染后 48 h 裂解细胞,检测细胞裂解液中的荧光素酶活性. 检测试剂为 Promega 公司产品 Dual-Luciferase[®] 双萤光素酶报告基因检测系统,检测过程参照说明书进行.

1.6 流式细胞术检测细胞中 P-gp 的表达

将筛选出的高效的 pSUPER-siRNA 表达质粒与 pCMV-*mdr1* 共转染,转染后细胞经消化后制成细胞悬液,约 1×10^6 个细胞,1 000 r/min 离心 3 min, PBS 洗 1 次. 用 1 mL 含体积分数为 5% 人血清的 PBS 重悬细胞,4 °C 孵育 10 min,1 000 r/min 离心 3 min 去上清. 加入 100 μL 含标记抗体 Phycoerythrin (PE) Anti-Human MDR1(原始质量浓度 0.1 mg/mL,按 1:20 稀释)的 PBS,避光孵育 60 min 后离心弃上清,用 PBS 洗涤离心 2 次,加入 1 mL PBS 重悬,使用 EPICS XL 流式细胞仪进行检测,数据采用 CellQuest 软件分析. 同时设立 pSUPER-siB245 表达质粒与 pCMV-*mdr1* 共转染组(siB245 组)、pSUPER 空载体与 pCMV-*mdr1* 共转染组(vector-control 组)、仅转染 pCMV-*mdr1* 组(cell-control 组)为对照组.

1.7 CCK-8 kit 检测细胞毒性

将携带 siMDR1B 表达元件的载体 pSUPER-siMDR1B 转染 A2780 细胞,应用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测 siMDR1 表达对细胞活性的影响. 预先铺 100 μL A2780 细胞于 96 孔细胞培养板中(1.5×10^4 个/孔),4 h 后转染 $0.6 \mu\text{g}$ 相应质粒 pSUPER-siMDR1,并以转染 pSUPER 空载体、仅加入脂质体及空

细胞组为对照,3 孔重复. 培养 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37 °C 反应 4 h 后,在酶标仪上测定 OD_{450}/OD_{620} 值.

2 结 果

2.1 靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 的设计与表达载体的构建

本研究以 *mdr1* 基因为靶序列设计 siRNA. 有研究显示 siRNA 抑制效率与其所对应的靶 mRNA 序列的茎环结构存在相关性^[8]. 本研究应用 siRNA 设计软件设计靶向 *mdr1* 基因的 siRNA,同时应用 mRNA 结构分析软件对 siRNA 靶序列所在的 *mdr1* 基因 mRNA 序列的二级结构进行分析,选择了 3 个分别靶向茎/环结构的 siRNA 靶序列进行评价(图 2),其中 siMDR1A、siMDR1C 靶向茎结构,siMDR1B 靶向环结构. 将 siRNA 靶序列分别克隆至 pSUPER 载体,经酶切鉴定后获得分别靶向 *mdr1* 基因不同靶点的 siRNA 表达载体.

2.2 共转染实验检测靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 的抑制效率

在报告质粒的报告基因终止密码子后连接 siRNA 靶序列,可用于在共转染实验中通过检测报告基因表达水平分析特定 siRNA 的抑制效率^[11]. 本研究通过将 siRNA 表达质粒与报告质粒共转染的方法检测靶向 *mdr1* 基因的不同 siRNA 的抑制效率. 结果如图 3 所示,所构建的 siRNA 均可获得抑制效果,其中靶向环结构的 siMDR1B 具有相对较高的抑制效率,

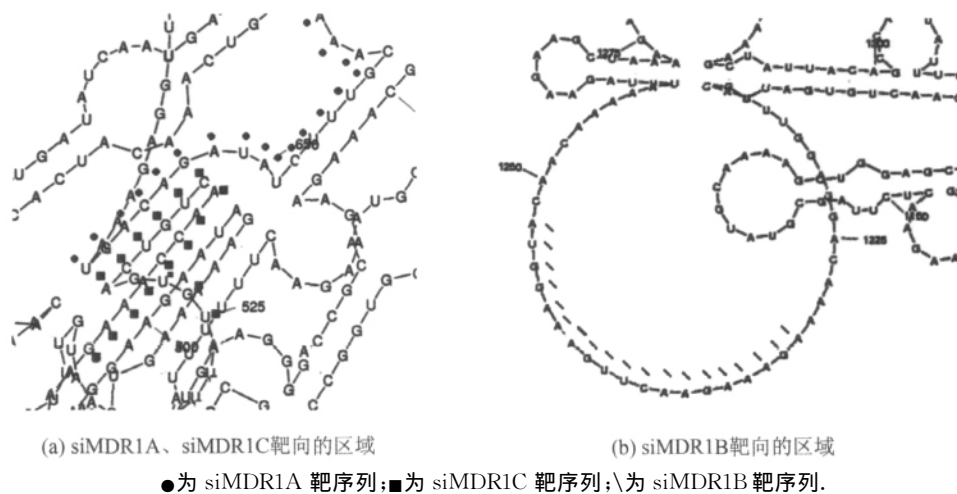


图 2 *mdr1* 基因转录的 mRNA 部分序列的二级结构

Fig. 2 Secondary structure of partial sequence of mRNA of *mdr1* gene

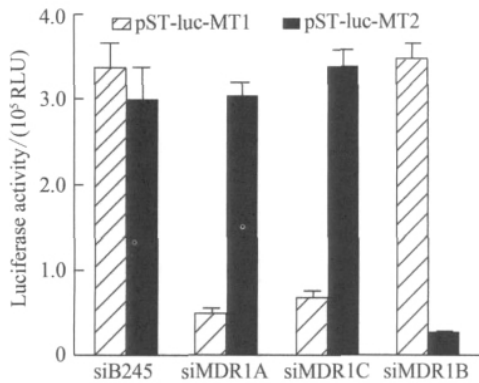


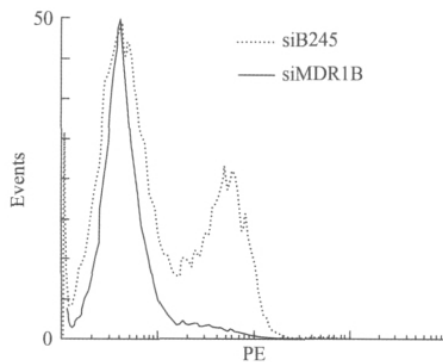
图3 靶向 *mdr1* 的 siRNA 表达质粒与报告质粒共转染后细胞的 LUC 活性

Fig. 3 LUC activity of cells co-transfected with siRNA targeting *mdr1* gene expression vector and reporter plasmid

优于 siMDR1A 和 siMDR1C ($p < 0.05$). 同时其也具有有良好的抑制特异性, 可有效抑制 pST-luc-MT2 的表达, 但不能抑制 pST-luc-MT1 的表达, 因此选择 siMDR1B 用于下一步的评价.

2.3 siMDR1B 对 *mdr1* 基因表达产物 P-gp 的抑制效果

本研究进一步在体外培养细胞内评价了 siMDR1B 对 *mdr1* 基因表达产物 P-gp 的抑制效果. pCMV-*mdr1* 为含有全长 *mdr1* 基因表达元件的表达质粒, 可在细胞中表达出 *mdr1* 基因产物 P-gp. 将 siMDR1B 表达质粒 pSUPER-siMDR1B 及对照质粒分别与 pCMV-*mdr1* 在 A2780 细胞中进行共转染. 应用可特异结合 P-gp 的单克隆抗体与流式细胞仪检测细胞中 P-gp 蛋白的表达水平, 结果如图 4 所示, 与转染对照 siRNA 表达质粒 pSUPER-siB245 相比, 转染 pSUPER-siMDR1B 细胞



(a) 流式细胞仪检测 P-gp 含量

的 P-gp 蛋白活性明显降低, 与对照相比对 P-gp 蛋白的抑制效率为 65.5%, 说明 siMDR1B 对 *mdr1* 基因表达具有较好的抑制效果.

2.4 siMDR1B 的脱靶效应分析

本研究进一步检测了靶向 *mdr1* 基因的 siMDR1B 对细胞活性的影响. 将携带 siMDR1B 表达元件的载体 pSUPER-siMDR1B 转染 A2780 细胞, 应用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测 siMDR1B 表达对细胞活性的影响. CCK-8 检测方法与经典检测细胞活性的 MTT 法原理基本一致, 具有操作更简单、结果更稳定等优点^[12], 可用于评价 siRNA 的脱靶效应, 结果如图 5 所示, 设定空白细胞组细胞活性为 100%, 计算实验组相对细胞活性, 发现转染了 pSUPER-siMDR1B 的细胞与对照相比未引起显著的细胞毒性增加或细胞活力下降 ($p = 0.696$), 说明 siMDR1B 的表达不会影响细胞的增殖和代谢作用.

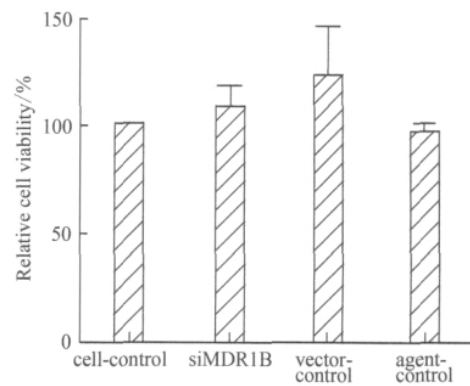
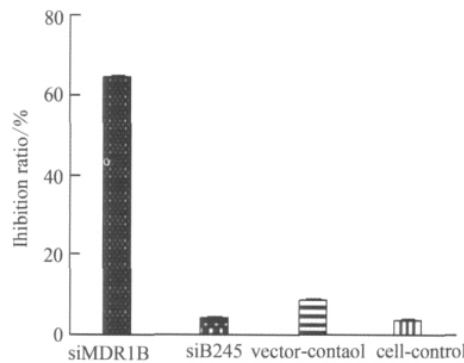


图5 CCK-8 方法检测 siRNA 的脱靶效应

Fig. 5 Detection of off-target effects of siRNAs by CCK-8 kit



(b) siRNA 对 P-gp 的抑制率

图4 pSUPER-siMDR1B 在转染后细胞中对 *mdr1* 基因表达产物 P-gp 的抑制效率

Fig. 4 Inhibition efficiencies of P-gp expression encoded by *mdr1* gene in cells transfected with pSUPER-siMDR1B

3 讨 论

MDR 是导致肿瘤化疗失败的重要原因, 研究显示肿瘤细胞 *mdr1* 基因编码的 P-gp 蛋白的大量表达与 MDR 产生密切相关^[2]. 通过抑制 *mdr1* 基因的表达可用于逆转 MDR. RNAi 是近年来迅速发展起来的一种新型的基因表达抑制技术, 具有抑制率高、特异性好的优点, 这使其在抑制 *mdr1* 基因研究以及逆转 MDR 治疗方法研究中具有良好的应用潜力. 研究显示, 不同的 RNAi 靶点对基因的抑制效率存在差异^[13], 通过筛选获得具有高抑制效率和特异性的 RNAi 元件是十分必要的. 本研究筛选获得了一个可有效抑制 *mdr1* 基因表达同时具有良好抑制特异性的 siRNA 元件 (siMDR1B), 可为进一步开展相关研究提供重要基础.

mdr1 基因属于一个小基因家族, 在人类中包括 *mdr1* 及 *mdr2* 基因, 其中只有 *mdr1* 基因与 MDR 有关^[1,14], 可编码长度为 1 280 个氨基酸残基的多肽链, 即 P-gp. *mdr1* 基因较大, mRNA 结构较为复杂. 有研究显示, RNA 干扰靶点的抑制效率与靶点所在 mRNA 局部序列的二级结构状态有关, 而与其是否为翻译区关系不大^[15]. 在 RNAi 抗 HIV 研究中发现, siRNA 靶序列临近区域的基因突变可通过改变病毒 RNA 的二级结构从而影响靶序列与 siRNA 元件结合进而使 HIV 逃避 RNAi 干扰^[16]. 茎环结构是 RNA 具有的重要的二级结构特征, 其中环结构松散, 较易于被蛋白或其他核酸结合^[17-18]. 有研究认为靶向 HBV 基因 RNA 环状结构的 siRNA 可具有较高的抑制效率, 可能与环结构松散易于被 siRNA 接近有关^[8]. 本研究在进行靶向 *mdr1* 基因的 siRNA 设计中, 同时应用 mRNA 结构分析软件对候选 siRNA 靶序列所在的 mRNA 进行了分析. 对比抑制效率评价的结果显示, 虽然 3 个候选 siRNA 均表现出抑制效果, 但靶向 *mdr1* 基因 mRNA 环结构的 siMDR1B 相比靶向茎结构的 siRNA 具有较高的抑制效率, 说明针对靶向 mRNA 的环结构可有助于获得更高抑制效率的 siRNA.

由于 *mdr1* 基因表达产物 P-gp 蛋白的分子质量较大, 在 siRNA 筛选实验中采用常规免疫检测方法灵敏度偏低, 且方法较为复杂. 已报道报告基因 *eGFP*^[19-20]、*luc*^[21-22] 用于评价目的蛋白的表达情况, 其中 *luc* 报告基因表达的检测具有易于量化检测的优点, 更适合用于 siRNA 的快速筛选评价. 为此, 本研究采用了将 *luc* 报告质粒系统用于靶向 *mdr1* 基因的

siRNA 抑制效率的评价, 通过将包含有不同 siRNA 靶序列的 DNA 序列连接于 *luc* 报告基因的终止密码子与 polyA 转录终止信号序列之间构建报告质粒, 再与 siRNA 表达质粒进行共转染后通过检测 *luc* 报告基因的表达水平即可测算出 siRNA 的抑制效率. 同时, 将携带不同靶序列的 *luc* 报告质粒用于评价 siRNA 的抑制特异性. 本研究应用该方法筛选获得的 siMDR1B 具有良好的抑制效果, 同时脱靶效应分析显示不会影响细胞活性, 具有良好的应用潜力, 可为进一步应用于逆转 MDR 研究提供基础.

参考文献:

- [1] Juliano R, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455(1): 152-162.
- [2] Kato A, Miyazaki M, Ambiru S. Multidrug resistance gene (MDR-1) expression as a useful prognostic factor in patients with human hepatocellular carcinoma after surgical resection [J]. *Surg Oncol*, 2001, 78(2): 110-115.
- [3] Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(5): 626-630.
- [4] Hannon G. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [5] Pecot C, Calin G, Coleman R, et al. RNA interference in the clinic: challenges and future directions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(1): 59-67.
- [6] Fire A, Xu S, Montgomery M, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [7] Peng J, Zhao Y, Mai J, et al. Inhibition of Hepatitis B Virus replication by various RNAi constructs and their pharmacodynamic properties [J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86: 3227-3234.
- [8] Chen Y, Du D, Wu J, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311: 398-404.
- [9] Ding Y, Chan C, Lawrence C. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 135-141.
- [10] Zhang Y L, Cheng T, Cai Y J, et al. RNA Interference inhibits Hepatitis B Virus of different genotypes *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 214.
- [11] Liu Y P, Haasnoot J, Brake O. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA poly-

- cistron[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(9): 2811-2824.
- [12] Birke K, Kopsachilis N, Lindl T, et al. Evaluation of the applicability of the MTT viability assay in 3-dimensional hemi-cornea constructs[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51: 6237.
- [13] Holen T, Amarzguioui M, Wiiger M T, et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(87): 1757-1766.
- [14] Chen C, Chin J, Ueda K. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDR1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells[J]. *Cell*, 1986(47): 381-389.
- [15] Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(2): 691-699.
- [16] Westerhout E M, Ooms M, Vink M, et al. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(2): 796-804.
- [17] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment; RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. *Science*, 1990, 249: 505-510.
- [18] Schudoma C, May P, Nikiforova V, et al. Sequence-structure relationships in RNA loops; establishing the basis for loop homology modeling [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(3): 970-980.
- [19] Zhou L, Yang J. Screening and identification of mouse Bicc1 RNAi[J]. *Dongwuxue Yanjiu*, 2010, 31(1): 84-88.
- [20] Yang N, Li S, Lü Y, et al. Attenuated salmonella typhimurium carrying shRNA-expressing vectors elicit RNA interference in murine bladder tumors[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(3): 368-374.
- [21] Birch R G, Shen B, Brett J, et al. Evaluation and application of a luciferase fusion system for rapid *in vivo* analysis of RNAi targets and constructs in plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(4): 465-475.
- [22] Maliyekkela A, Shtutmana M, Shaoc Y, et al. Function-based gene identification using enzymatically generated normalized shRNA library and massive parallel sequencing [J]. *PNAS*, 2010, 107(16): 7377-7382.

Construction and Identification of siRNA Targeting to Multidrug Resistance Gene 1

LIN Yan-zhen¹, ZHANG Ya-li², LI Rui-yin², YANG Lian-wei²,
CHENG Tong², WEN Lan-ling^{1*}

(1. Zhongshan Hospital Xiamen University, Xiamen 361004, China; 2. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The over-expression of *mdr1* gene is the main reason of multidrug resistance(MDR) of tumor cells. Inhibiting the expression of *mdr1* gene can be used to reverse the MDR. RNA interference(RNAi) is a sequence-specific intracellular mechanism of gene silencing. In this study, the construction of small interfering RNAs(siRNAs) element against *mdr1* gene effectively and specifically were explored. Three siRNA sequences targeting to mRNA stem or loop structure separately were selected based on the sequence of *mdr1* gene. Using various reporter plasmids containing different target sequences, the inhibition efficiencies and specificities of the constructs against *mdr1* gene were determined and siMDR1B targeting to the loop structure was selected from the candidates. siMDR1B expression vector was then co-transfected with the *mdr1* gene expression vector in cells, and the expression level of P-gp protein encoded by *mdr1* gene was analysed by immune flow cytometry. Results showed that P-gp protein expression can be effectively inhibited by siMDR1B in transformed cells comparing to control cells. CCK-8 assay was used for cell viability analysis in this study, and results showed that cell viability was not affected by siMDR1B expression in transformed cells. In conclusion, siMDR1B is a promising candidate for the next research on MDR reverse.

Key words: *mdr1* gene; RNA interference; siRNA