论著

文章编号:1000-5404(2008)09-0840-04

人结肠癌耐药细胞系HT29/L-OHP的建立及其生物学特性

向 征,张才全,汤为学 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆市普通外科学重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 建立人结肠癌奥沙利铂耐药细胞系HT29/L-OHP,探讨结肠癌对奥沙利铂(Oxaliplatin,L-OHP)产生耐药的特征规律和耐药的机制。方法 采用逐步递增L-OHP浓度,间歇作用体外诱导法培养建立了人结肠癌L-OHP耐药细胞模型HT29/L-OHP。MTT法测定生长曲线、交叉耐药性和耐药指数;并用光镜、电镜、流式细胞仪(FCM)等方法观察其一般生物学特性的改变。结果 历时3个月建成了L-OHP耐药细胞模型HT29/L-OHP,其耐药性能稳定,耐药指数为10.64;并且与5-氟尿嘧啶、长春新碱、阿霉素等多种抗癌药有不同程度的交叉耐药性。HT29/L-OHP的细胞形态及染色体数目发生了改变;体外细胞群体倍增时间较亲代细胞延长29.71 h;细胞周期分析结果显示其S期与G_0/G_1期细胞减少、G_2/M期细胞增多。结论 HT29/L-OHP细胞是模拟临床用药特点建立的耐药性较稳定的多药耐药细胞,具有耐药细胞的基本生物学特性,是研究L-OHP耐药机制及筛选逆转剂的理想细胞模型。

关键词:人结肠癌细胞;多药耐药;奥沙利铂
中图法分类号:R329.2;R73-354;R735.35 文献标识码:A

Establishment and biological characteristics of human colon carcinoma multidrug-resistant cell line HT29/L-OHP

XIANG Zheng, ZHANG Cai-quan, TANG Wei-xue (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish a drug-resistant human colon cancer cell line to oxaliplatin (L-OHP) based on cell line HT29. Methods A resistant cell line-HT29/L-OHP was established by gradually increasing the dose of L-OHP and intermittent administration. The growth curves, multidrug resistance and resistance index of HT29/L-OHP cell line to anticancer agents were detected by MTT assay. The changes of its biological characteristics were determined by light microscopy, electron microscopy, and flow cytometry. Results HT29/L-OHP cell line was established after 3 months, which had stable resistance to L-OHP and a resistance index of 10.64. HT29/L-OHP cells exhibited cross resistance to many other chemotherapeutic agents. As compared with parental cells, the morphological and chromatosome number of HT29/L-OHP were changed; its doubling time was prolonged; and the number of cells in S phase and G_0/G_1 phase were decreased while in G_2/M phase increased. Conclusion HT29/L-OHP cell line shows the typical multidrug-resistant phenotype.

Key words: human colon cancer cells; multidrug resistance; oxaliplatin

奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)是一种含有1、2-二氨环己烷(DACH)基团的新铂类化疗药物。它克服了Ⅰ、Ⅱ代铂类的主要毒性[1],作为一种具有良好应用前景的抗癌药物日益引起人们的重视,是目前临床治疗结肠癌最常用的抗癌药物之一,具有较广泛的抗瘤谱。因此,研究肿瘤细胞对奥沙利铂产生耐药的发生机制,为临床探索克服奥沙利铂耐药性的有效途径提供了可靠依据,具有十分重要的意义。鉴于目前国内外尚缺乏人结肠癌耐奥沙利铂的细胞模型,本研究以奥沙利铂为诱导剂,建立了人结肠癌奥沙利铂耐药细胞模型,并对亲代细胞系与耐药细胞系进行了对比研究,以期寻找出肿瘤细胞对奥沙利铂产生耐药的可能机制,为临床筛选耐药逆转剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤细胞系 HT29为人结肠癌细胞系,由重庆医科大学基础医学院病理学教研室提供。

1.1.2 试剂与药品 RPMI1640培养液(Gibco BRL公司),新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),四甲基偶

作者简介:向 征,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的基础和临床方面的研究。电话:(023)89011014,E-mail:xzly@medmail.com.cn

收稿日期:2007-12-18;修回日期:2008-01-22

氮唑盐（MTT，上海华舜生物工程有限公司），二甲基亚砜（DMSO，重庆医药股份有限公司化玻分公司），奥沙利铂（L-OHP，江苏恒瑞医药股份有限公司），5-氟尿嘧啶（5-FU，上海旭东海普药业有限公司），阿霉素（ADM，浙江海正药业股份有限公司），丝裂霉素（MMC，日本协和发酵工业株式会社），长春新碱（VCR，上海华联药业有限公司）。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　将 HT29 细胞接种到含 10% 热灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中，置 37 ℃，5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养（SHEL LAB 2300 型，美国），细胞呈单层贴壁生长。传代时用 0.1% 胰酶 -0.02% EDTA 溶液消化，台盼蓝拒染法计算活细胞数。

1.2.2　奥沙利铂耐药细胞系 HT29/L-OHP 的建立　　取对数生长期 HT29 细胞，胰酶消化，离心，制成细胞悬液，调整细胞数为 1×10^5 ml^{-1}，取 10 ml 细胞悬液接种至培养瓶中。培养液中加入 L-OHP 溶液，使其终浓度为 4 μmol/L（1/3 IC_{50}），连续作用 48 h，弃去含药培养液。加入新鲜培养液，继续培养 48 h。待其恢复正常生长，消化传代后复用 4 μmol/L L-OHP 溶液连续作用 48 h。如此反复换液、传代，逐步提高 L-OHP 浓度（4 μmol/L→5 μmol/L→6 μmol/L→7 μmol/L→8 μmol/L→9 μmol/L→10 μmol/L→11 μmol/L→12 μmol/L→13 μmol/L→14 μmol/L→15 μmol/L）间歇诱导，最终获得 1 株能耐受 15 μmol/L L-OHP 的细胞系，命名为 HT29/L-OHP，并将其维持培养在含 4 μmol/L L-OHP 的完全培养液中。

1.2.3　MTT 法检测各种抗癌药的细胞毒作用[2]　　取对数生长期 HT29 和 HT29/L-OHP 细胞，胰酶消化，离心，制成细胞悬液，调整细胞数为 5×10^4 ml^{-1}。取 96 孔培养板，每孔加入 200 μl 细胞悬液，并加入倍比稀释成 5 种浓度的各种抗癌药物各 20 μl，每一浓度重复 8 孔，设试剂对照组及细胞对照组，置 37 ℃，5% CO_2 孵箱内培养 72 h。离心 1 000 r/min × 10 min，小心吸去上清液，每孔加无血清培养液 200 μl 及 5 mg/ml MTT 20 μl，继续培养 4 h。1 000 r/min 离心 10 min，小心吸去上清液，每孔加 200 μl DMSO，置于微量振荡器上振荡 5 min，自动酶标读数仪（Bio-Rad 2550 型，美国）上测出各孔吸光度值 [D(570)]，检测波长为 570 nm。计算每浓度的存活率 存活率 = $D(570)_{实验组}$ / $D(570)_{对照组}$ × 100%。根据中效方程式[3] $fa/fu = (D/Dm)^m$（fu：存活率，fa：1 − fu，D：药物剂量，Dm：中效剂量，m：Hill 型系数）进行中效作图，计算出 HT29 与 HT29/L-OHP 细胞对各种抗癌药物的半数抑制浓度（IC_{50}）及耐药指数（RI）。RI = IC_{50}（耐药细胞）/IC_{50}（亲本细胞）。

1.2.4　细胞形态学观察　　光镜观察（瑞氏染色法）：收集 HT29 与 HT29/L-OHP 细胞接种至内铺预先处理的小玻片的 24 孔培养板内，置于 37 ℃，5% CO_2 孵箱内培养 72 h 后用 PBS 洗 2 遍，瑞氏染液染色 10 min，再用 PBS 洗 2 遍，室温晾干，中性树胶封片，光镜下观察、拍照。

透射电镜观察：收集 HT29 与 HT29/L-OHP 细胞，用 2.5% 戊二醛固定，继用 2% 四氧化锇固定，脱水、包埋、切片和染色按常规处理，透射电镜（HITACHI-600 型，日本）观察、拍照。

1.2.5　细胞群体倍增时间和细胞生长曲线测定　　取对数生长期 HT29 与 HT29/L-OHP 细胞，胰酶消化，离心，制成细胞悬液，调整细胞数为 5×10^4 ml^{-1}。取 2 ml 细胞悬液接种至 15 ml 培养瓶内，共 21 瓶，置于 37 ℃，5% CO_2 孵箱内培养。自第 1 天开始用台盼蓝拒染法，以血球计数板进行活细胞计数，每日取 3 瓶细胞，计算均值，连续观察 7 d。按 Patterson 公式[4] 计算群体倍增时间（T_D）：$T_D = T \times \lg 2/(\lg Nt - \lg No)$（No：初始细胞数，Nt：终末细胞数，T：Nt − No 时间）。调整 2 种细胞的细胞数为 5×10^3 ml^{-1}，接种 8 块 96 孔板，每孔 200 μl（1×10^3/孔），各设 6 个平行孔，用 MTT 法每天测 2 种细胞的吸光度值。根据结果以培养时间为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制细胞生长曲线。

1.2.6　细胞染色体的制备和分析　　对数生长期 HT29 与 HT29/L-OHP 细胞的培养液中加入 5 μg/ml 秋水仙碱，使其终浓度为 0.05 μg/ml，37 ℃作用 2 h。胰酶消化收获细胞，1 000 r/min 离心 5 min，去上清液，加入 37 ℃预热的 0.075 mol/L KCl 溶液 6 ml，低渗处理 20 min。离心 1 000 r/min × 5 min，去上清液，加 3 ml 新鲜固定液（甲醇∶冰醋酸 = 3∶1），固定 20 min。离心 1 000 r/min × 5 min，去上清液，加 3 ml 新鲜固定液，再固定 20 min。离心 1 000 r/min × 5 min，去上清液，视细胞量再加 0.5 ~ 1.0 ml 新鲜固定液，吹打均匀，滴片，空气中干燥。用 Giemsa 染色液染色 10 min，流水冲洗，晾干，油镜下观察。

1.2.7　流式细胞仪分析细胞周期分布　　收集 HT29 与 HT29/L-OHP 细胞，PBS 洗 2 次。1 000 r/min 离心 5 min，去上清液，缓慢加入 − 20 ℃预冷的 70% 乙醇，固定 1 h。PBS 洗 2 次，将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合，4 ℃放置 30 min。将样品放入流式细胞仪（FACS Calibur BD，美国）的样品室，以激发波长 488 nm 测定，并用 Modfit LT 2.0 软件分析细胞周期分布。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行多组比较方差分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两样本均数比较采用成组 t 检验，计数资料比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　HT29/L-OHP 耐药细胞系的建立及耐药稳定性

本实验采用逐步递增培养液中 L-OHP 浓度，间歇作用的方法，对 HT29 细胞进行体外诱导筛选，历时 3 个月获得了在 15 μmol/L L-OHP 作用下生长良好的耐药细胞系 HT29/L-OHP。用 MTT 法测得 HT29 细胞对 L-OHP 的 IC_{50} 为 11.95 μmol/L，HT29/L-OHP 细胞对 L-OHP 的 IC_{50} 为 127.22 μmol/L，耐药指数（RI）为 10.64。在脱离 L-OHP 培养 1 个月后再次用 MTT 法测 HT29/L-OHP 细胞对 L-OHP 的 IC_{50} 为 115.12 μmol/L，RI 为 9.63，耐药性保持 90.51% 以上。冻存的 HT29/L-OHP 细胞 3 个月经复苏后仍能稳定生长、增殖，测其对 L-OHP 的 IC_{50} 为 125.90 μmol/L，RI 为 10.53，耐药性保持不变。

2.2　HT29/L-OHP 对几种抗癌药物的多药耐药性

HT29/L-OHP 细胞不仅对 L-OHP 产生耐药，而且对另外 4 种临床常用的抗癌药物也有不同程度的耐药性，具有多药耐药特征，结果见表 1。

表1 HT29细胞与HT29/L-OHP细胞的药敏性

药物	IC_{50}(μmol/L)		RI
	HT29	HT29/L-OHP	
L-OHP	11.95	127.23	10.64
VCR	0.60	4.30	7.17
5-FU	364.50	2 269.90	6.23
ADM	8.00	44.98	5.62
MMC	1.65	4.72	2.85

2.3 细胞形态学观察

2.3.1 光镜 HT29细胞呈上皮样单层排列,细胞大小不一,为多角形,边界清楚,核大圆形或椭圆形,细胞质少,见图1。HT29/L-OHP细胞同样呈上皮样单层排列,细胞大小不一,细胞体积增大,部分细胞变形并有多核巨细胞产生,细胞核大,不规则,细胞质少,见图2。

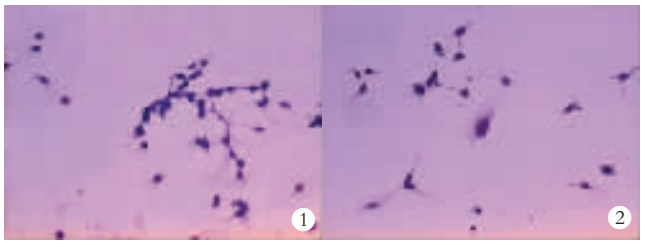


图1 HT29细胞形态学观察 (瑞氏染色×200)

图2 HT29/L-OHP细胞形态学观察 (瑞氏染色×200)

2.3.2 透射电镜 HT29细胞核形态不规则,常染色质发达,细胞表面微绒毛丰富,见图3。HT29/L-OHP细胞核大,核畸形多见,可见假性包涵体,常染色质发达,细胞表面微绒毛减少、变短,细胞质内粗面内质网轻度扩张,见图4。

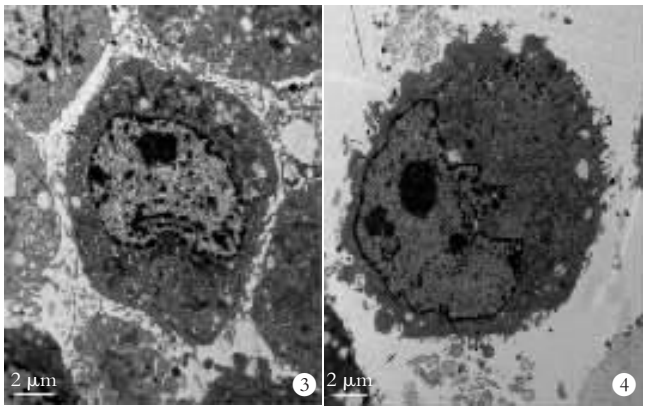


图3 HT29细胞超微结构观察 (TEM)

图4 HT29/L-OHP细胞超微结构观察 (TEM)

2.4 细胞生长曲线和细胞群体倍增时间

以培养时间为横坐标,细胞培养1~7 d的吸光度值为纵坐标,绘制生长曲线,如图5所示(HT29细胞的公式为:$y=0.187\,1x+0.080\,5$,$r^2=0.993\,9$;HT29/L-OHP细胞的公式为:$y=0.070\,4x+0.069\,7$,$r^2=0.984\,6$)。通过细胞计数,计算得到HT29细胞与HT29/L-OHP细胞的群体倍增时间分别为30.13 h和59.84 h,耐药细胞的群体倍增时间较亲代细胞延长了29.71 h,两者相比较差异显著($P<0.01$)。

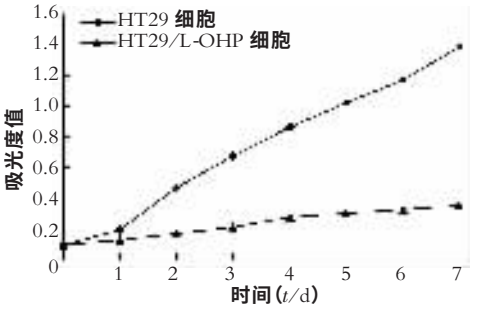
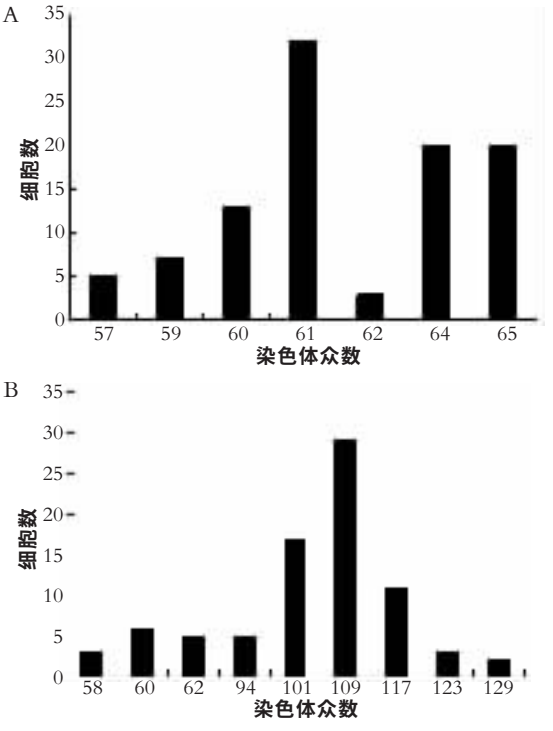


图5 HT29细胞与HT29/L-OHP细胞的生长曲线

2.5 细胞染色体分析

HT29细胞与HT29/L-OHP细胞各计数100个分散好的核型,结果HT29细胞染色体众数分布集中于60~65,HT29/L-OHP细胞染色体分布集中于94~117,如图6所示。



A:HT29细胞;B:HT29/L-OHP细胞

图6 HT29细胞与HT29/L-OHP细胞的染色体数目分布

2.6 细胞周期分布

HT29细胞经L-OHP体外诱导获得耐药性后,其对数生长期的增殖速度减慢。经FCM进行细胞周期分布分析结果显示HT29/L-OHP细胞G_2/M期细胞增多,S期、G_0/G_1期细胞减少(表2)。

表2 HT29细胞与HT29/L-OHP细胞的周期分布

细胞	G_0/G_1	S	G_2/M
HT29	63.64	32.21	4.15
HT29/L-OHP	55.63[a]	27.91[a]	16.46[a]

a:$P<0.05$,与HT29细胞比较

3 讨论

肿瘤细胞对抗癌药物产生耐药性是肿瘤化疗失败

的主要原因，也是临床迫切需要解决的难题。由于肿瘤细胞发生耐药的机制十分复杂，建立理想的耐药细胞模型是研究肿瘤细胞对化疗药物耐药的产生和逆转不可缺少的重要手段。体外利用耐药肿瘤细胞系是一重要途径。尽管体外研究与体内研究有较大差异，用于临床需谨慎，但是体外研究用药量小，研究对象来源可靠充分，操作简便，可快速获得实验结果，条件控制严格，与体内相关性较好。因此，从化疗药物的筛选到肿瘤 MDR 机制及逆转的研究均离不开体外研究[5]。至今为止，国内外学者已经建立了多种肿瘤耐药细胞系。这类离体的耐药细胞模型较好的模拟了人类肿瘤化疗后发生的 MDR 现象。由此可见，建立 MDR 细胞系是研究肿瘤 MDR 发生机制的前提和基础，也是研究 MDR 逆转剂的必要条件。

本研究以奥沙利铂为诱导剂，采用逐步递增奥沙利铂浓度间歇作用体外诱导，先用 1/3 IC_{50} 的浓度（4 μmol/L）开始，快速递增药物浓度，历时 3 个月培养建立了模拟临床用药特点的人结肠癌奥沙利铂耐药细胞模型 HT29/L-OHP。HT29/L-OHP 细胞对 L-OHP 的耐药性为 HT29 细胞的 10.81 倍。在脱离 L-OHP 作用 1 个月后，其对 L-OHP 的耐药指数虽然有所下降，但仍保持在 90% 左右，表现出较为稳定的耐药性，冻存 3 个月的 HT29/L-OHP 细胞经复苏后仍能稳定生长、增殖，其对 L-OHP 的耐药性保持不变（RI = 10.53）。该细胞系不仅对 L-OHP 产生耐药，而且对从未接触过的 5-FU、ADM、MMC、VCR 等结构及作用机制不同的抗癌药也产生了不同程度的耐药性。Snow 和 Judd[3] 认为，RI 小于 5 是低度耐药，RI 为 5 ~ 15 是中度耐药，RI 大于 15 是高度耐药。按此标准划分，HT29/L-OHP 细胞对 L-OHP、5-FU、VCR、ADM 为中度耐药，对 MMC 为低度耐药。说明 HT29/L-OHP 细胞具有 MDR 特征，且耐药性能稳定，是研究 L-OHP 耐药机制及筛选逆转剂的理想的 MDR 细胞模型。

形态上 HT29/L-OHP 细胞与其亲本 HT29 细胞存在差异。光镜下可见其细体积略增大，部分细胞变形，并有多核巨细胞形成，多核巨细胞的出现表明细胞受到损伤和细胞分裂减少。本实验流式细胞检测表明 G_2/M 期阻滞。在肿瘤细胞的超微结构改变中，细胞核的变化是反映细胞分化程度的一个重要标志。本研究表明，HT29/L-OHP 的细胞核大，核畸形及假性包涵体多见，表明其分化程度较 HT29 细胞低，其细胞表面微绒毛变少、变短，细胞的表面积减小，表明耐药细胞的代谢、分裂活动减弱。

在本研究中我们通过绘制生长曲线，测定细胞群体倍增时间，观察到 HT29/L-OHP 细胞的生长增殖速度减慢，其群体倍增时间较亲本 HT29 细胞延长了 29.71 h（$P < 0.01$）。细胞周期分布分析结果显示 HT29/L-OHP 细胞与 HT29 细胞相比，G_2/M 期细胞增多，S 期与 G_0/G_1 期细胞减少（$P < 0.05$），也证实了 HT29 细胞经 L-OHP 诱导获得耐药性后其对数生长期的增殖速度减慢，这种现象在其他耐药细胞中也有发生[4]。而关于肿瘤倍增时间与化疗疗效的关系，目前认为肿瘤的倍增时间越短，对化疗药物较敏感，疗效较好；反之，肿瘤的倍增时间越长，对化疗药物的敏感性亦降低[6]。

有研究者曾从细胞动力学角度论述肿瘤细胞耐药性的产生，他们认为肿瘤细胞在增殖过程中，一部分细胞会发生突变，其突变率为 $1:10^5 \sim 1:10^6$，每次突变均可导致抗药瘤株的出现，随着倍增次数的增多，抗药瘤株出现的概率也越大[7]。本研究中采用的 L-OHP 是作用于 DNA 的抗肿瘤药物，本身就具有突变剂的作用，可诱导细胞基因突变。因此，在外界给予 L-OHP 作用，将敏感细胞杀灭，而耐药细胞存活并增殖成为肿瘤细胞群中的干系细胞，呈现对抗癌药物的耐药性。HT29/L-OHP 细胞染色体数目的改变就说明了耐药细胞与亲本细胞在遗传物质基础上已发生了变化。推测有两种可能：一是染色体数目多的细胞对药物适应，产生生存优势而出现耐受现象；一是药物作用促使细胞产生适应性改变而出现染色体数目增多。具体的因果关系尚有待进一步研究。

参考文献：

[1] Voland C, Bord A, Peleraux A, *et al*. Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(9): 2149 – 2157.

[2] 向　征，张才全，汤为学. 奥沙利铂抗人结肠癌细胞株 HT29 增殖及其机制的研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(7)：606 – 609.

[3] Snow K, Judd W. Characterisation of adriamycin- and amsacrine-resistant human leukaemic T cell lines[J]. Br J Cancer, 1991, 63(1): 17 – 28.

[4] 张立阳，赵玉沛，吴元德，等. 胰腺癌阿霉素耐药细胞株 SW1990/ADM 的建立及其耐药机制研究[J]. 中国普外基础与临床杂志，2005，12(1)：46 – 50.

[5] Rosell R, Lord R V, Taron M, *et al*. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2002, 38(3): 217 – 227.

[6] Maeno Y, Nakazawa S, Yamamoto N, *et al*. Osteopontin participates in Th1-mediated host resistance against nonlethal malaria parasite Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice [J]. Infect Immun, 2006, 74(4): 2423 – 2427.

[7] 张天泽，徐光炜. 肿瘤学[M]. 天津：天津科学技术出版社，1996：716 – 717.

（编辑　龙　亮）