论著

文章编号:1000-5404(2011)21-2256-04

人乳腺癌MCF-7他莫昔芬耐药细胞株的建立及鉴定

莫志强,涂 刚,罗浩军,李振华,杨光伦 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科)

[摘要] **目的** 构建人乳腺癌细胞MCF-7他莫昔芬(Tamoxifen,TAM)耐药细胞模型,并鉴定其耐药性。**方法** 采用高浓度短时间4-羟他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen,OHT)冲击法,诱导人乳腺癌MCF-7/TAM耐药细胞株。通过细胞形态学观察、生长曲线、细胞倍增时间、药物毒性实验、细胞周期及凋亡相关蛋白BIK和Caspase-7的检测,评价MCF-7/TAM耐药细胞株的耐药性。**结果** 成功构建MCF-7/TAM耐药细胞株,其耐药指数(resistance index,RI)为(13.88±2.93)($P<0.05$)。与其母细胞相比,MCF-7/TAM耐药细胞株不仅细胞形态发生了变化,生长增殖能力增强($P<0.05$),细胞倍增时间缩短($P<0.05$),而且对OHT介导的毒性效应有较强的抵抗能力($P<0.05$),OHT不能促进MCF-7/TAM耐药细胞内BIK和Caspase-7蛋白的表达($P<0.05$)。**结论** 通过高浓度短时间OHT冲击法诱导的MCF-7/TAM耐药细胞株对TAM产生一定的耐药性。

[关键词] 乳腺癌; 他莫昔芬; 耐药细胞株
[中图法分类号] R73-354; R734.2; R969.3 [文献标志码] A

Establishment and identificantion of a Tamoxifen-resistant cell line of MCF-7 human breast cancer

Mo Zhiqiang, Tu Gang, Luo Haojun , Li Zhenhua, Yang Guanglun (Department of Endocrine Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a Tamoxifen (TAM)-resistant cell line of MCF-7 human breast cancer and to investigate the drug resistance of the cell line. **Methods** MCF-7 Tamoxifen-resistant (MCF-7/TAM-R) cell line was induced by a high concentration of 4-hydroxytamoxifen (OHT) treatment for a short period. Drug resistance of MCF-7/TAM-R cells were determined by cell morphology, cell growth curve, cell doubling time, drug toxicity tests, cell cycle and expression of apoptosis-related proteins BIK and Caspase-7. **Results** MCF-7/TAM-R cell line was successfully established, and its drug resistance index (RI) was 13.88 ± 2.93 ($P<0.05$). Compared with its parental cell line, MCF-7/TAM-R cell line exhibited a different cell morphology, a higher proliferation ability ($P<0.05$), a shorter cell doubling time ($P<0.05$) and a stronger resistance to OHT-mediated cytotoxic effects ($P<0.05$). OHT failed to induce the expression of BIK and Caspase-7 ($P<0.05$) in MCF-7/TAM-R cell line. **Conclusion** MCF-7/TAM-R cell line induced by a high concentration of OHT for a short period has a significant resistance to TAM.

[**Key words**] breast cancer; tamoxifen ; resistance cell subline

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81072149). Corresponding author: Yang Guanglun, Tel: 86-23-89011191, E-mail: guanglunyang@163.com

他莫昔芬(Tamoxifen, TAM)是ER-α阳性的乳腺癌患者内分泌治疗中重要的组成药物,但是在长期治疗的过程中常会继发TAM耐药。为了深入研究乳腺癌继发TAM耐药的分子机制,建立一个稳定的耐药细胞模型是其重要的基础。本实验通过高浓度短时间4-羟他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen,OHT)冲击法[1]诱导人乳腺癌MCF-7/TAM耐药细胞模型,并对其耐药性进行初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药物与主要试剂

人乳腺癌MCF-7细胞系购于中国科学院上海细胞生物所,DMEM培养液、胎牛血清和0.125%胰酶购于Gbico公司,四甲

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072149)
[通信作者] 杨光伦,电话:(023)89011191,E-mail:guanglunyang@163.com

基偶氮唑盐、二甲基亚砜(DMSO)及4-羟他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen,OHT)购于Sigma公司,免疫印迹化学发光剂ECL购于Millipore公司,SDS配胶试剂、鼠抗人β-actin抗体购于碧云天生物技术有限公司,兔抗人BIK抗体购于Bioworld公司,兔抗人Caspase-7抗体购于Cell signaling公司。

1.2 实验方法

1.2.1 MCF-7细胞株的培养 5%胎牛血清、10 mg/L胰岛素的DMEM培养液,37 ℃、5% CO_2饱和温度培养箱中培养MCF-7细胞,0.125%胰蛋白酶消化传代。每次取处于对数生长期的细胞用于实验(MCF-7W细胞)。

1.2.2 TAM耐药细胞株的诱导 采用高浓度短时间OHT冲击法[1]诱导MCF-7/TAM耐药细胞株。取对数生长期的MCF-7W细胞约1×10^7个,接种于直径为10 cm的培养皿中,待细胞生长稳定后加入终浓度为1×10^{-6} mol/L的OHT,2~3 d换液1次,每次换液后加入等浓度的OHT。经过21 d的培养后,通过有限稀释法获得单克隆的乳腺癌TAM耐药细胞,并在7 d无药物干预下扩增细胞。为了维持MCF-7/TAM耐药细胞株的耐药性,细胞长期在终浓度为1×10^{-7} mol/L的OHT的培养液中培养(MCF-7R细胞)。

1.2.3 HE染色比较细胞形态学观察 取对数生长的MCF-7W和MCF-7R细胞,以1×10^5/ml分别接种于玻片上。待细胞贴壁后,使用4%的多聚甲醛在室温下固定20 min,固定结束后用PBS清洗2遍。然后加入苏木精染色液10 min,用水冲洗多余的染色液,95%乙醇浸泡5s,滴加伊红染色液,最后用70%的乙醇洗涤2次。染色完毕后,在倒置相差显微镜下观察二者的细胞形态差异。

1.2.4 细胞生长曲线测定 将对数生长的MCF-7W和MCF-7R细胞,按每孔5×10^3/ml分别接种于96孔板中,同时设3个复孔。以24 h为间隔,每孔加入浓度为5×10^3 mg/L的MTT 10 μl。37 ℃孵育4 h后,倒去培养液,加入200 μl DMSO,于振荡器上震荡10 min后,用酶标仪检测490 nm波长处吸光值[D(490)],连续观察7 d。

1.2.5 MTT法检测药物敏感性实验 取对数生长期的MCF-7W和MCF-7R细胞,调整细胞数为5×10^3/ml,分别接种于96孔板中。待细胞生长稳定后,弃原培养液,每孔重新加入含OHT的培养液200 μl,设置5个浓度梯度,分别设3个复孔,阴性对照组加入相同体积的乙醇。培养48 h后,使用MTT实验检测其D(490)。计算细胞抑制率=[1-加药组平均D(490)/对照组平均D(490)]×100%,确定TAM的半数抑制浓度(50% inhibiting concentration,IC_{50}),最后计算MCF-7R细胞的耐药指数(resistance index,RI)=IC_{50}(MCF-7R)/IC_{50}(MCF-7W)。

1.2.6 流式细胞术检测TAM对细胞周期的影响 取对数生长期的MCF-7W和MCF-7R细胞,调整细胞数为1×10^4/ml,分别接种于6孔板中,设对照组和药物组。待细胞生长稳定后,药物组加入终浓度为1×10^{-6} mol/L的OHT继续培养,对照组加入终浓度为1×10^{-6}mol/L的乙醇。经48 h培养后,收集细胞并制备成细胞悬液,用70%冰乙醇固定过夜。次日,加入20 mg/L PI和2×10^5mg/L RNaseA避光染色30 min,经200目尼龙网过滤后,使用流式细胞分选仪检测各组细胞相细胞的百分比。

1.2.7 Western blot测定细胞中BIK和Caspase-7表达 取对数生长期的MCF-7W和MCF-7R细胞,调整细胞数为1×10^6个/ml,分别接种于6孔板中。待细胞生长稳定后,把加入终浓度为1×10^{-6} mol/L OHT的细胞设置为药物组,加入终浓度为1×10^{-6} mol/L的乙醇设置为对照组。经48 h培养后,收集细胞并提取总蛋白。用考马斯亮蓝G250法测定蛋白浓度,按50 μg上样电泳。电泳结束后,使用半干转膜法转印到PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗4 ℃孵育过夜后,洗涤3次,每次10 min,二抗室温孵育2 h,洗涤3次,每次10 min,使用ECL化学发光试剂盒显影,通过CCD凝胶成像系统采集图像以及Quantity One软件分析条带。

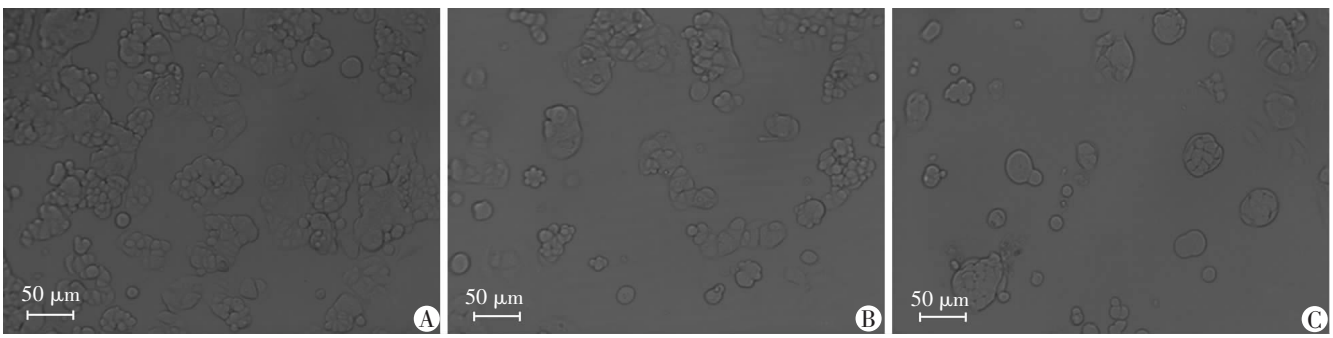
1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,使用SPSS 17.0统计软件,实验重复3次,两组样本的均数比较采用t检验。

2 结果

2.1 高浓度OHT短时间冲击法可诱导出MCF-7R细胞

通过终浓度为1×10^{-6} mol/L的OHT持续干预法,成功诱导出MCF-7R细胞。高密度的MCF-7W细胞(图1A)在培养的第5~10天,会有大量的细胞死亡(图1B)。而在培养的20 d,培养皿内会有细胞集落形成(图1C)。最后经过21 d的干预,获得了单克隆的MCF-7R细胞。

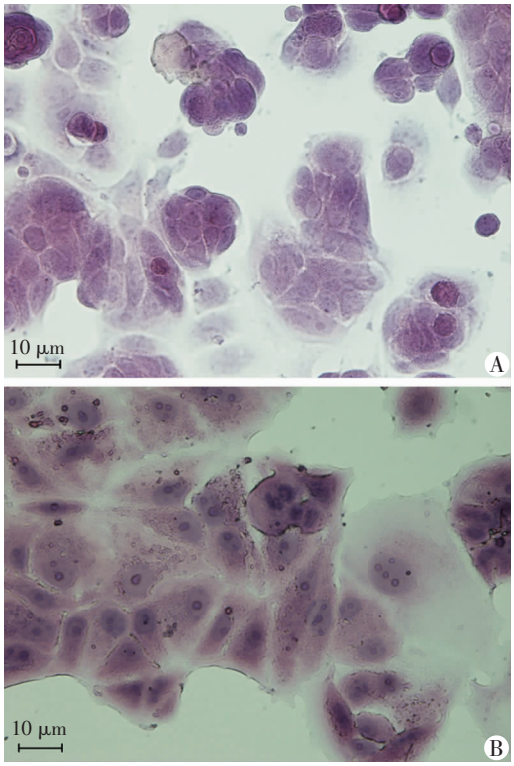


A:诱导前的MCF-7细胞;B:诱导5 d的MCF-7细胞;C:诱导21 d的MCF-7细胞

图1 高浓度OHT诱导MCF-7R细胞的过程

2.2 细胞形态学变化

在倒置相差显微镜下，MCF-7W 和 MCF-7R 细胞均为贴壁生长。MCF-7W 细胞相互镶嵌，铺路石样团簇生长，细胞多呈椭圆形，体积中等，大小均匀，核仁清晰，细胞核较小（图 2A）。而 MCF-7R 细胞较为扁平，以尖角形和多角形为主，排列无规则，体积较大，核仁大且明显，同时可见多核现象（图 2B）。



A：MCF-7W；B：MCF-7R

图 2 HE 染色后 MCF-7W 和 MCF-7R 细胞形态

2.3 细胞生长曲线

经 MTT 试验绘制的细胞体外生长曲线提示，两株细胞在体外培养的第 6 天达到生长增殖的高峰。MCF-7W 细胞的体外倍增时间为（96.31 ± 12.98）h，而 MCF-7R 细胞则为（78.18 ± 4.53）h。与 MCF-7W 细胞相比，MCF-7R 细胞的倍增时间显著缩短（$P<0.05$），表现出更强的增殖能力

2.4 TAM 对 MCF-7W 和 MCF-7R 细胞毒性作用的检测

不同浓度的 OHT 干预 MCF-7W 和 MCF-7R 细胞 48 h 后，MTT 结果提示两株细胞对 OHT 的敏感性存在着显著的差异（$P<0.05$）。低浓度（1×10^{-8} mol/L）的 OHT 已经对 MCF-7W 细胞产生了抑制效应，但此浓度的 OHT 不仅没有抑制 MCF-7R 细胞的生长，而且会促进其增殖。OHT 对 MCF-7W 和 MCF-7R 细胞的 IC_{50} 分别为［（1.30 ± 0.04）$\times10^{-3}$］mol/L 和［（18.03 ± 4.36）$\times10^{-3}$］mol/L。与 MCF-7W 细胞相比，MCF-7R 细胞的 RI 为（13.88 ± 2.93）倍（$P<0.05$）。提示 MCF-7R 细胞对 TAM 产生了显著的耐药性。

2.5 TAM 对 MCF-7W 和 MCF-7R 细胞细胞周期影响的检测

流式细胞术检测发现，MCF-7W 细胞经 OHT 干预 48 h 后（表 1），细胞周期的 G_0/G_1 期由（69.98 ± 0.69）% 增加至（88.13 ± 0.10）%，S 期比例由（24.76 ± 0.72）% 下降至（4.30 ± 1.09）%，并且在 G_0/G_1 峰前检测到（12.32 ± 1.55）% 的凋亡峰（$P<0.05$）。而 MCF-7R 细胞经过相同的处理后（表 1），G_0/G_1 期和 S 期无显著的改变（$P>0.05$）。两株细胞经过相同的处理后细胞 S 期的改变具有显著的统计学差异（$P<0.05$）。提示 TAM 对 MCF-7W 细胞的细胞周期负性调节效应，在 MCF-7R 细胞被显著抑制内，说明 MCF-7R 细胞能够有效抵抗 TAM 的负性调节效应。

表 1 MCF-7W 和 MCF-7R 细胞流式细胞术分析结果

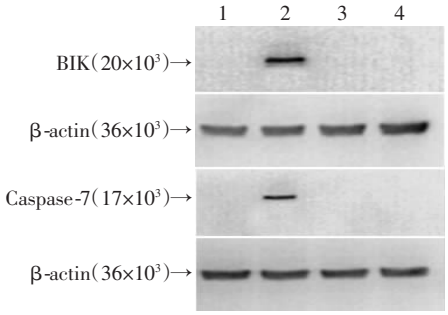
［$n=1\times10^4$，$(\bar{x}\pm s)$%］

细胞株	G_0/G_1	S	G_2/M	细胞凋亡
MCF-7W	69.98 ± 0.69[a]	24.766 ± 0.72[a]	5.26 ± 0.80[a]	0[a]
MCF-7W + OHT	88.13 ± 0.10	4.30 ± 1.09	7.57 ± 1.16	12.32 ± 1.55
MCF-7R	61.15 ± 0.72	28.42 ± 0.54	10.43 ± 0.21	0
MCF-7R + OHT	62.08 ± 0.37[a]	27.98 ± 0.37[a]	9.94 ± 0.86[a]	0[a]

a：$P<0.05$，与 MCF-7W + OHT 比较

2.6 BIK 和 Caspase-7 蛋白表达的差异

经 1×10^{-6} mol/L 的 OHT 干预 MCF-7W 和 MCF-7R 细胞 48 h，使用 Western blot 方法检测细胞内凋亡相关蛋白的表达后，发现 OHT 可以促进 MCF-7W 细胞内 BIK 和 Caspase-7 蛋白表达的上调，但是在 MCF-7R 细胞内 OHT 却不能够促进以上两种蛋白的表达（图 3）。Quantity One 软件灰度分析结果显示，MCF-7W 细胞经 OHT 干预后，BIK 与 Caspase-7 蛋白的表达量由干预前的（7.13 ± 0.42）$\times10^{-2}$ 和（4.54 ± 0.45）$\times10^{-2}$ 分别增加至（59.20 ± 1.93）$\times10^{-2}$ 和（41.18 ± 2.39）$\times10^{-2}$，两种蛋白表达量的变化具有显著的统计学意义（$P<0.05$），而 MCF-7R 细胞经 OHT 干预后 BIK 与 Caspase-7 蛋白的表达量分别为（6.25 ± 0.91）$\times10^{-2}$ 和（3.26 ± 0.45）$\times10^{-2}$，与干预前的表达量（5.84 ± 0.90）$\times10^{-2}$ 和（3.65 ± 0.51）$\times10^{-2}$ 相比无明显统计学意义（$P>0.05$）。说明 MCF-7R 细胞可以有效抵抗 TAM 引起的细胞毒性效应。



1：MCF-7W 组；2：MCF-7W + OHT 组；3：MCF-7R 组；4：MCF-7R + OHT 组

图 3 Western blot 检测 OHT 对各组 BIK 与 Caspase-7 蛋白表达水平的影响

3 讨论

临床研究证实，以 TAM 为主的内分泌治疗可以显

著改善 ER-α 阳性的乳腺癌患者 5 年生存率[2]，但是耐药事件的发生将大大限制 TAM 临床应用价值。TAM 的耐药机制及耐药性的逆转一直是研究的热点。因此建立 TAM 耐药细胞株是体外研究乳腺癌内分泌治疗抵抗的重要基础。Criscitiello 等[3]认为乳腺癌组织内常表现出高度的异质性。Fan 等[4]的研究则进一步指出人乳腺癌 MCF-7 细胞株继成了乳腺癌组织表现型和基因型多态性的特点。过去，乳腺癌 TAM 耐药细胞亚型主要通过长时间低浓度 TAM 或者去除雌激素法诱导建立[4]。但 Coser 等[1]认为传统的诱导方法忽略了 MCF-7 乳腺癌细胞的表型和基因多态性。同时他认为 TAM 耐药细胞亚型已经存在于多克隆的 MCF-7 乳腺癌细胞中。因此，我们通过高浓度的 TAM 冲击法[1]成功诱导出 MCF-7/TAM 耐药细胞亚型。张雪梅等[5]研究发现乳腺癌的阿霉素耐药细胞亚型与其母细胞的细胞形态存在显著差异，并且他们认为细胞表型的差异可能与耐药的发生存在着联系，但其具体机制尚不清楚。与人乳腺癌 MCF-7 细胞相比，我们构建的 MCF-7R 细胞不仅在形态上发生了改变，而且其对 TAM 的抵抗能力显著增强（$P<0.05$），其 RI 为（13.88±2.93）倍（$P<0.05$），与向征等[6]报道的人结肠癌耐细胞的研究相似。Powles 等[7]的研究指出 TAM 及 OHT 主要与乳腺癌细胞核内的 ERα 结合，使大多数肿瘤细胞滞留在细胞相中的 G_0/G_1 期，降低处于 S 期的细胞比例，从而达到抑制肿瘤生长增殖的效果。我们通过流式细胞术检测发现，MCF-7W 细胞经过 OHT 干预 48 h 后，处于 G_0/G_1 期的细胞比例显著增加，处于 S 期的细胞比例则明显减少，并且在 G_0/G_1 峰前出现一凋亡峰（$P<0.05$）。当 MCF-7R 细胞经过同样的处理后，细胞相却没有发生明显变化（$P>0.05$）。结果提示 MCF-7R 细胞能够有效抵抗 TAM 介导的负性调节作用。Jordon 等[2]在其他乳腺癌耐药细胞株研究中有相似的发现。本研究发现，在 OHT 干预下，MCF-7R 细胞的 S 期比例明显高于 MCF-7W 细胞（$P<0.05$），即细胞复制和分裂活跃。实验结果提示 MCF-7R 细胞的细胞周期调控环存在着失控。这与 Hackshaw 等[8]的一项关于 TAM 治疗早期乳腺癌随机试验的回顾分析结果相似。Hodges-Gallagher 等[9]研究发现在人乳腺癌细胞 MCF-7 内，Bcl-2 蛋白家族的促凋亡因子 BIK 可以抑制其家族中的 Bcl-2 和 Bcl-X 因子介导的增殖效应。Fan 等[4]研究发现，半胱氨酸蛋白水解酶 Caspase-7 可以特异性地切割 MCF-7W 细胞内含天冬氨酸肽键的蛋白，引起肿瘤细胞的程序性死亡。本研究发现，OHT 可以上调 MCF-7W 细胞内 BIK 和 Caspase-7 蛋白的表达（$P<0.05$），激活凋亡相关信号通路，促进细胞的凋亡。但是在 MCF-7R 细胞内，OHT 不能够上调以上两种蛋白的表达（$P>0.05$）。因此，我们构建的 MCF-7R 可以有效抑制 TAM 介导的凋亡效应，对 TAM 产生了一定的耐药性。

总之，本研究通过高浓度 TAM 短时间冲击法[1]培养出 MCF-7R 细胞后，发现其形态与母细胞存在着明显的差异，而且对 TAM 细胞毒效应产生了较强的抵抗力，符合 TAM 耐药细胞的特征。证实了短时间冲击法可以成功诱导出稳定的 TAM 耐药细胞，为深入研究乳腺癌继发 TAM 耐药的机制提供了重要的实验条件。

参考文献：

[1] Coser K R, Wittner B S, Rosenthal N F, *et al*. Antiestrogen-resistant subclones of MCF-7 human breast cancer cells are derived from a common monoclonal drug-resistant progenitor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(34): 14536-14541.

[2] Jordan V C. A century of deciphering the control mechanisms of sex steroid action in breast and prostate cancer: the origins of targeted therapy and chemoprevention[J]. Cancer Res, 2009, 69(4): 1243-1254.

[3] Criscitiello C, Fumagalli D, Saini K S, *et al*. Tamoxifen in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer: overview of clinical use and molecular biomarkers for patient selection[J]. Onco Targets Ther, 2010, 4: 1-11.

[4] Fan P, Wang J, Santen R J, *et al*. Long-term treatment with tamoxifen facilitates translocation of estrogen receptor alpha out of the nucleus and enhances its interaction with EGFR in MCF-7 breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1352-1360.

[5] 张雪梅，杨秀蓉，吴华，等. 线粒体凋亡途径在 H_2O_2 诱导耐阿霉素人乳腺癌细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(15)：1475-1478.

[6] 向征，张才全，汤为学. 人结肠癌耐药细胞系 HT29/L-OHP 的建立及其生物学特性[J]. 第三军医大学学报，2008，30(9)：840-843.

[7] Powles T J, Ashley S, Tidy A, *et al*. Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial[J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(4): 283-290.

[8] Hackshaw A, Roughton M, Forsyth S, *et al*. Long-term benefits of 5 years of tamoxifen: 10-year follow-up of a large randomized trial in women at least 50 years of age with early breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(13): 1657-1663.

[9] Hodges-Gallagher L, Valentine C D, El-Bader S, *et al*. Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 109(2): 241-250.

（**收稿**：2011-06-08；**修回**：2011-08-19）

（编辑 龙 亮）