文章编号:1000-5404(2011)21-2297-03

短篇论著

人乳腺癌多西紫杉醇耐药细胞株的建立及特性

李文静[1],张 磊[2],赖娅娜[2],唐金海[3],钟山亮[1],恽 文[3],赵建华[1] (210009 南京,南京医科大学附属江苏省肿瘤医院:临床检验中心[1],科研科第三实验室[2],普外科[3])

[摘要] **目的** 建立人乳腺癌多西紫杉醇(Docetaxel,Doc)耐药细胞模型MCF-7/Doc,初步探讨其生物学特性。**方法** 采用Doc低浓度逐步加量诱导法建立MCF-7/Doc耐药株;通过细胞形态学观察、生长曲线和群体倍增时间测定、MTT法药物敏感试验及流式细胞术评价其生物学特性;实时荧光定量PCR和Western blot分别检测多药耐药基因MDR1 mRNA和蛋白的表达。**结果** 经10个月的诱导成功建立MCF-7/Doc细胞株,可在100 ng/ml Doc培养液中稳定生长,耐药指数为亲代敏感细胞MCF-7/S的33.3倍,对其他多种化疗药物呈交叉耐药状态。光镜下,药物处理后细胞变圆变小、核分裂象减少;MCF-7/Doc倍增时间较MCF-7/S延长[(41.6±1.6) h *vs* (30.6±1.1) h;$P<0.01$]。与亲代相比,耐药细胞处于G_1期和G_2期的细胞增加、S期减少;MDR1基因表达水平增高90.7倍,蛋白表达转为阳性,而雌激素受体阳性表达丢失。**结论** MCF-7/Doc细胞具有典型的多药耐药性,MDR1基因和蛋白过表达是其获得性耐药的主要机制之一。

[关键词] 乳腺癌细胞;多西紫杉醇;多药耐药;P糖蛋白
[中图法分类号] R73-354; R734.2; R969.3 [文献标志码] A

乳腺癌属全身性疾病,综合治疗非常关键,其中化疗是不可替代的重要手段之一。然而多药耐药(multi-drug resistance, MDR)常导致治疗失败及后期肿瘤的复发和转移,严重威胁患者生存。多西紫杉醇(Doc)是在天然抗肿瘤药物紫杉醇的基础上,经结构修饰后获得的一种新型抗肿瘤药物,溶解性好,药效更优。临床实践表明,以Doc为主的联合化疗是乳腺癌、尤其是淋巴结阳性患者最有希望的治疗方案[1]。但耐药问题也不容忽视,其对转移性乳腺癌的治疗反应率为30%~50%[2]。耐药细胞株是研究肿瘤MDR发生和逆转的重要模型。本研究通过低剂量逐步加量法体外诱导建立人乳腺癌多西紫杉醇耐药株,并对其生物学及耐药特性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞株MCF-7/S为典型的雌激素受体(ER)阳性细胞株,分离自人乳腺腺癌组织上皮(上海细胞生物所);Doc、顺铂和卡铂(齐鲁制药),紫杉醇(太极制药)、多柔比星(海正药业)、吉西他滨(豪森药业)、他莫昔芬(扬子江药业)、甲氨蝶呤和依托泊苷(恒瑞医药)、羟喜树碱(李时珍药业);四甲基偶氮唑盐(MTT,Sigma);鼠抗人P-gp单克隆抗体(ABcam);辣根过氧化物酶(HRP)标记抗小鼠IgG(康为生物)、HRP标记抗兔IgG(博士德生物)。

1.2 细胞培养

MCF-7/S细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM高糖培养液,在37℃、5% CO_2饱和湿度条件下培养,经2~3次传代后至指数生长期进行实验。

1.3 MCF-7/Doc的建立

测定Doc对MCF-7/S的半数致死浓度(IC_{50});以IC_{50}的1/1 000 Doc为起始浓度作用MCF-7/S细胞24 h,生理盐水洗5遍,撤药常规培养并每天换液去除死细胞,7~18 d后存活细胞生长恢复,待进入对数生长期后传代1次,继续培养至生长良好且稳定时进行浓度逐步递增性诱导(梯度为10 ng/ml);如此反复,历时10个月,至细胞能在100 ng/ml Doc培养液中稳定地传代生长。双目倒置显微镜下观察各时段细胞的生长情况。

1.4 生长曲线测定

将对数期MCF-7/S和MCF-7/Doc细胞经胰酶消化后制成2×10^4单细胞悬液,接种于24孔板,接种后第1~5天计数,每次计数3孔取平均值,绘制生长曲线。按Patterson公式计算细胞在对数生长期的倍增时间(T_d):$T_d = Tlg2/lg(N_T/N_0)$,T为细胞数由N_0增至N_T所用的时间,N为细胞数。

1.5 细胞IC_{50}及耐药指数RI的检测

1.5.1 MCF-7对Doc的敏感性 取1×10^5/ml MCF-7/S或MCF-7/Doc单细胞悬液,接种于96孔板,100 μl/孔;培养24 h后加入含相应浓度药物的培养液100 μl/孔,每个药物浓度设4个复孔,同时设空白组和无药对照组;继续培养48 h,MTT法染色,CliniBio128酶标仪检测550 nm处的吸光度值,计算生长抑制率:生长抑制率 = 1 -(实验组平均吸光值/对照组平均吸光值)×100%;根据生长抑制率计算IC_{50}[3]和RI,RI = IC_{50}(MCF-7/Doc)/ IC_{50}(MCF-7/S)。独立重复3次。

1.5.2 交叉耐药性 按上述方法分别检测MCF-7/S和MCF-7/Doc细胞对常规化疗药物:紫杉醇、多柔比星、甲氨蝶

[基金项目] 江苏省社会发展科技计划(BS2007077);国家自然科学基金(30840093)
[通信作者] 赵建华,E-mail:jhzhao2838@sina.com

吟、羟喜树碱、卡铂、顺铂、依托泊苷、吉西他滨及内分泌治疗药物他莫西芬的 IC_{50}，计算各 RI。

1.6 细胞周期分布

取对数期细胞消化制成单细胞悬液，1 ml 预冷 70% 酒精固定，-20 ℃过夜，PBS 洗 2 次，碘化丙啶（PI）避光染 30 min，以流式细胞仪（美国 BD FACSCalibur）于 FLA-2 参数下检测细胞周期，定量分析各时期的百分率及凋亡、坏死细胞的百分率。独立重复 3 次。

1.7 MDR1 基因相对定量

使用 Trizol 法，提取细胞总 RNA，测 $D(260)/D(280)$ 值并计算其纯度和 RNA 含量；按 BU-Script RT KIT 说明，反转录合成 cDNA。取 2 μl cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR（RT-qPCR；Bio-Rad iCycle 扩增仪）。MDR1 引物：上游 5′-GTTGCTGCTTACATTCAGGTTTC-3′，下游 5′-ACCAGCCTATCTCCTGTCGC-3′，*Taq*Man 探针：TTGGTGCCTGGCAGCTGGAAGAC；β-actin 引物：上游 5′-ACCGAGCGCGGCTACAG-3′和下游 5′-CTTAATGTCACGCAGATTTCC-3′，探针：TTCACCACCACGGCCGAGC。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 MDR1 mRNA 的相对表达量。

1.8 Western blot 检测 P-gp 和 ER 的表达

蛋白上样量 80 μg，100 V 电泳 2 h；300 mA 湿转 2 h；室温封闭 1 h；P-gp 鼠单抗（1∶500）、ER 兔单抗（1∶200）、β-actin 鼠单抗（1∶5 000）4℃过夜；HRP 标记抗鼠二抗（1∶2 000）、HRP 标记抗兔二抗（1∶9 000）室温 1 h；ECL 液暗室发光显影。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件行 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

上皮来源的 MCF-7/S 细胞贴壁生长，呈长梭形或多角形、排列均匀，可见较多分裂象细胞。加入 Doc 24 h 后，细胞发生明显改变，胞体变圆变小，折光性增强，分裂象细胞数明显减少，且敏感细胞不断死亡，需数次换液不断清除死细胞，最后仅存少数贴壁细胞。这些细胞不规则突起增多，胞体变大，空泡增多，继续培养中仍会有少量细胞崩解死亡，但随着撤药时间的延长，撤药 20 d 左右，存活细胞可恢复原来的形态并成团生长（图 1）。

2.2 细胞生长曲线

MCF-7/S 和 MCF-7/Doc 细胞的倍增时间分别为（30.6 ± 1.1）h、（41.6 ± 1.6）h，增殖速度明显减慢（$t = -9.797$，$P < 0.01$）。

2.3 细胞的耐药特性

与 MCF-7/S 相比，MCF-7/Doc 不仅对 Doc 有较高的耐药性，对其他多种药物也存在不同程度的交叉耐药性；其中对甲氨蝶呤、羟喜树碱有强的耐药，对紫杉醇、多柔比星、吉西他滨有较强耐药，对他莫西芬有轻度耐药，而对卡铂、顺铂及依托泊苷无明显耐药性（表 1）。

表 1 MCF-7/S 和 MCF-7/Doc 细胞的药物敏感性（$n = 3$）

药物	IC_{50}（mg/L，$\bar{x} \pm s$）		RI
	MCF-7/S	MCF-7/Doc	
多西紫杉醇	2.49 ± 0.87	82.89 ± 5.21	33.29
紫杉醇	0.39 ± 0.13	7.80 ± 2.07	20.00
多柔比星	0.86 ± 0.24	18.37 ± 0.98	21.36
甲氨蝶呤	0.02 ± 0.01	3.71 ± 0.99	185.35
羟喜树碱	0.14 ± 0.03	44.33 ± 2.60	310.00
卡铂	39.57 ± 6.36	43.67 ± 2.36	1.10
顺铂	4.57 ± 0.94	4.63 ± 0.84	1.01
依托泊苷	11.25 ± 1.26	14.69 ± 1.97	1.31
吉西他滨	0.32 ± 0.08	7.27 ± 1.84	22.72
他莫西芬	5.03 ± 0.11	14.87 ± 2.03	2.96

2.4 细胞周期

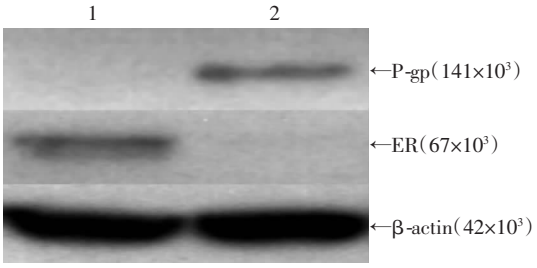
流式细胞仪结果显示，与 MCF-7/S 相比，MCF-7/Doc 处于 G_0/G_1 期细胞增加、S 期细胞减少、G_2/M 期细胞增加（表 2）。

表 2 MCF-7/S 和 MCF-7/Doc 细胞的周期分布[$n = 3$，($\bar{x} \pm s$) %]

细胞类型	G_0/G_1	S	G_2/M
MCF-7/S	54.19 ± 1.14	41.02 ± 6.37	1.57 ± 0.34
MCF-7/Doc	68.87 ± 6.44	25.67 ± 7.67	5.46 ± 2.67

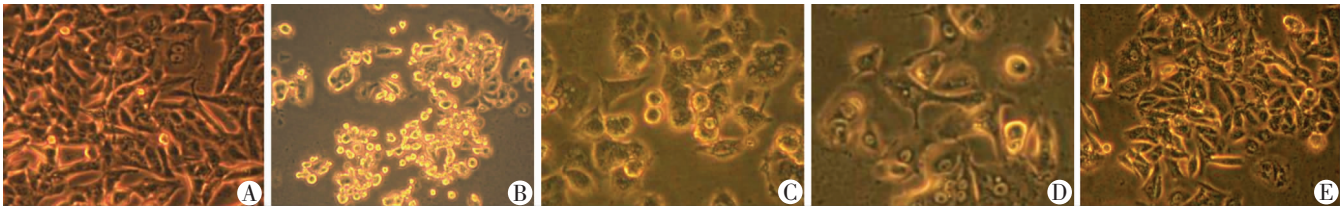
2.5 MDR1 基因和 P-gp、ER 蛋白的表达

RT-qPCR 结果显示，MCF-7/Doc 细胞 MDR1 mRNA 表达水平是 MCF-7/S 的（90.66 ± 6.28）倍（$F = 611.445$，$P < 0.01$）。Western blot 结果显示，MCF-7/S 不表达 P-gp，而 MCF-7/Doc 表达阳性，同时 ER 表达缺失（图 2）。



1：MCF-7/S；2：MCF-7/Doc

图 2 MCF-7/S 和 MCF-7/Doc 细胞 P-gp、ER 的表达



A：MCF-7/S；B：加药 24 h 后；C：撤药 3 ~ 5 d；D：撤药 7 ~ 10 d；E：撤药 20 d

图 1 倒置显微镜观察多西紫杉醇作用前后 MCF-7/S 细胞形态变化 （×100）

3 讨论

体外诱导肿瘤细胞耐药株的方法有低剂量逐步加量法和高剂量短时刺激法及两种方法的结合。相比之下,低剂量逐步加量法虽然操作繁琐、费时,但风险较小、易把握、成功率较高。本研究采用低剂量逐步加量法成功诱导出人乳腺癌耐多西紫杉醇 MCF-7/Doc 细胞株。与亲代细胞相比,MCF-7/Doc 生长速度明显减缓,被阻滞于 G_0/G_1 期,群体倍增时间延长,说明 MCF-7/S 在建模中经 Doc 诱导获得耐药性后处于慢周期甚至静息状态,对化疗药物的敏感性降低,从而具备了 MDR 特性。

本研究发现 Doc 诱导的 MCF-7/Doc 耐药株不仅对 Doc 耐药,而且对从未接触过的其他化疗药物如甲氨蝶呤、羟喜树碱、紫杉醇、多柔比星、吉西他滨等也表现为交叉耐药;说明可能有共同的途径参与了 MCF-7/Doc 耐药的形成,如 P-gp 的高表达。已有报道 P-gp 表达主要与生物碱类、蒽环类和鬼臼碱类抗癌药物耐药有关,而与烷化剂和铂类药物没有交叉耐药[4]。本结果"MCF-7/Doc 耐药株对卡铂和顺铂无明显耐药"也支持这点,为临床 Doc 耐药后药物选择提供了重要信息。

MDR 是临床化疗急需攻克的难题,其耐药相关机制仍未阐明。P-gp 过表达是目前公认的 MDR 生物学基础,也被认为是耐药细胞经典或最基本的标志[5]。P-gp 是一种跨膜糖蛋白,由人类 MDR 基因家族中与耐药有关的 MDR1 基因编码。它不仅作为药物外排泵保护细胞免受有毒物质侵袭,而且还可参与细胞的增殖、分化和凋亡,介导 MDR 产生[6]。本研究通过 RT-qPCR 及 Western Blot 发现 MCF-7/Doc 高表达 MDR1/P-gp,而 MCF-7/S 不表达,证实 P-gp 在 Doc 获得性耐药过程中被诱导产生并起关键作用。Naito 等[7]报道以 MDR1/P-gp 为靶点,3 μmol/L MS-209(一种喹啉类逆转剂)可完全逆转多药耐药实体瘤移植模型及细胞模型对 Doc 的抗性。可见 P-gp 与 Doc 耐药密切相关。

Iseri 等[8]发现不同耐药程度的细胞株 MCF-7/30 nmol/L Doc 和 MCF-7/120 nmol/L Doc,其基因表达模式不同;与 MCF-7/S 相比,某些基因如 MDR1、细胞外基质(ECM)相关基因、细胞因子和生长因子信号通路基因、活性氧(ROS)代谢和上皮间质转化(EMT)相关基因等,在 MCF-7/120 nmol/L Doc 中的表达差异比在 MCF-7/30 nmol/L Doc 中更明显,说明 MCF-7 获得 MDR 表型是一个逐步渐变、Doc 剂量依赖的过程,即相关基因表达差异程度随着耐药性的不断增强而增高。研究发现 EMT 过程与 MCF-7 耐 Doc 有关,在获得耐药性的同时,锌指转录因子 slug 和波形蛋白表达上调而钙粘蛋白(E-cadherin)表达下降[9]。

本研究还显示,耐药细胞对内分泌治疗药物他莫西芬的敏感性降低,推测可能与 ER 表达丢失有关。一些耐药相关微 RNA 通过对 ER 的调节可影响 MCF-7 细胞对他莫西芬的敏感性;如乳腺癌中 miR-221/miR-222、miR-206 通过直接与 ERa 的 3′UTR 相互作用,抑制其翻译,是转录后水平调节 ER 的一个分子机制,其异位表达可使 MCF-7 细胞对他莫西芬产生抵抗[10-11]。至于 ER 表达缺失是 MDR 产生的伴随现象,还是彼此因果关系尚不清楚,但这种交叉耐药现象使肿瘤治疗变得更加复杂和困难,需深入研究。

参考文献:

[1] von-Minckwitz G, Blohmer J U, Raab G, *et al*. *In vivo* chemosensitivity-adapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: the GEPARTRIO pilot study[J]. Ann Oncol, 2005, 16(1): 56-63.

[2] Noguchi S. Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers[J]. Cancer Sci, 2006, 97(9): 813-820.

[3] 赵斌, 葛金芳, 朱娟娟, 等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC50 的计算方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(9): 834-836.

[4] 檀碧波, 李勇, 王士杰. 胃癌多药耐药机制的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2009, 30(12): 1358-1360.

[5] Mizutani T, Masuda M, Nakai E, *et al*. Genuine Functions of P-Glycoprotein (ABCB1)[J]. Curr Drug Metab, 2008, 9(2): 167-174.

[6] Germano S, O'Driscoll L. Breast cancer: understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalised medicine[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9(3): 398-418.

[7] Naito M, Matsuba Y, Sato S, *et al*. MS-209, a quinoline-type reversal agent, potentiates antitumor efficacy of docetaxel in multidrug-resistant solid tumor xenograft models[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(2): 582-588.

[8] Iseri O D, Kars M D, Gunduz U. Two different docetaxel resistant MCF-7 sublines exhibited different gene expression pattern[J]. Mol Biol Rep, 2011, [Epub ahead of print].

[9] Iseri O D, Kars M D, Arpaci F, *et al*. Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern[J]. Biomed Pharmacother, 2011, 65(1): 40-45.

[10] Xin F, Li M, Balch C, *et al*. Computational analysis of microRNA profiles and their target genes suggests significant involvement in breast cancer antiestrogen resistance[J]. Bioinformatics, 2009, 25(4): 430-434.

[11] Adams B D, Furneaux H, White B A. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(5): 1132-1147.

(收稿:2011-08-28;修回:2011-10-09)
(编辑 汪勤俭)