技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-1224-03

# 小鼠 CT26 结肠癌耐药动物模型的建立

桂琳玲,金先庆,罗 庆
(重庆医科大学附属儿童医院普外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:化疗药物诱导建立小鼠 CT26 结肠癌多药耐药(Multidrug resistance,MDR)动物模型。方法:建立小鼠 CT26 结肠癌皮下肿瘤模型,5- 氟尿嘧啶和阿霉素联合化疗,MTT 法绘制化疗前后细胞株的生长曲线、计算倍增时间及对各化疗药物敏感性及耐药指数(Resistance index,RI),RT-PCR 检测化疗前后 MDR1b mRNA 表达情况,流式细胞技术检测多药耐药蛋白(P-glycoprotein,P-gp)外排功能。结果:耐药株的倍增时间比亲本细胞株长,化疗后肿瘤对放线菌素 D(ACT)、阿霉素(ADM)、长春新碱(VCR)、羟基喜树碱(HCPT)、5- 氟尿嘧啶(5-Fu)、柔红霉素(DAM)、依托泊甙(VP16)的 RI 分别为 29.3、26.4、10.9、7.0、5.8、3.0、2.8,敏感性降低。耐药株 MDR1b mRNA 表达水平比亲本细胞株高,对柔红霉素的外排能力明显高于亲本细胞株。结论:本实验成功建立肿瘤多药耐药的动物模型,为化疗后肿瘤继发多药耐药问题的研究提供动物模型,为提高化疗效果研究奠定基础。

【关键词】多药耐药;动物模型;化疗
【中国图书分类法分类号】R73-3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-02

# Establishment of multidrug resistant animal model in mice CT26 colon cancer cells

*GUI Lin-ling, et al*
(*Department of Pediatrie Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish the multidrug resistant animal model of CT26 colon cancer cells in mice with the use of chemotherapy. *Methods*: CT26 colon cancer cells were injected subcutaneously into the right oxters of the mice. Fluorouracil and doxorubicin were combined into chemotherapy. Drown growth curve and calculate doubling generation time, chemotherapeutics drug sensitivity and drug fast index number of the tumor cells before and after chemotherapy were evaluated by MTT method. Levels of MDR1b mRNA were measured by RT-PCR. Eliminate function of P-gp were measured by flow cytometer. *Results*: Doubling generation time of the persister was higher than the parent cells. Drug resistance indexes were 29.3, 26.4, 10.9, 7.0, 5.8, 3.0, and 2.8 respectively to ACT, ADM, VCR, HCPT, 5-Fu, DAM, and VP16 after chemotherapy and the drug sensitivity were lower .The levels of MDR1b mRNA increased after chemotherapy and P-gp excretive ability was higher than that of no chemotherapy group. *Conclusion*: The multidrug resistant animal model has established successfully, which provided animal model for our study and research in the acquired multidrug resistance, and established groundwork for the research in increasing the chemotherapy effect.

【Key words】Drug resistance; Animal model; Chemotherapy

肿瘤细胞多药耐药(Multidrug resistant,MDR)的主要原因应归于一个高度保守(从细菌到人类)的跨膜蛋白家族某些成员的过度表达,这个家族以 ATP 结合盒(ATP-binding cassette,ABC)为特征,因此称为 ABC 转运蛋白超家族。ABC 转运蛋白超家族是人类最大的转运蛋白基因家族,编码产物是一组跨膜蛋白,即 ABC 转运蛋白,ABC 转运蛋白在细胞的生长发育过程中起着重要的作用[1]。

MDR 分为原发耐药和继发耐药,继发耐药是指患者在初次接受化疗药物时敏感,以后对原药产生耐药并对同类或其他类药物产生交叉耐药,其治疗效果递减,称为继发耐药,原发性耐药和继发性耐药是目前某些临床化疗治疗肿瘤疗效差的重要原因之一[2]。

大量的研究表明肿瘤患者在接受化疗药物治疗以后肿瘤细胞中的 P-gp(ABC 转运蛋白之一)表达明显增高。在急性髓细胞性白血病诊断时 P-gp 的表达只有 30%。但在化疗药物治疗后复发的白血病的患者中其 P-gp 的表达大于 50%[3]。P-gp 过表达的肿瘤与患者存活率下降及预后差有相关性[4]。本试验通过建立体内化疗诱导 MDR的动物模型,探讨肿瘤细胞继发性耐药的生物学特征,为 MDR的逆转及如何提高化疗药物疗效提供研究基础。

作者介绍:桂琳玲(1982- ),女,硕士,
研究方向:肿瘤。
通讯作者:金先庆,男,教授,E-mail:etzhl@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 建立小鼠结肠癌细胞株 CT26 的肿瘤模型及化疗药物诱导耐药

CT26 小鼠结肠癌细胞株由华西医科大学馈赠，Balb/c 小鼠购于重庆医科大学动物中心，实验分为实验组和对照组，每组 7 只，每只接种肿瘤细胞数为 $5\times10^5$ 个，接种部位为右腋下。接种后第 3 d 对照组给予生理盐水腹腔注射作对照。而实验组给予化疗药物，5-Fu（上海旭东海普药业有限公司）0.1 mg/g 腹腔注射，连续 5 d 后间歇一周为一个疗程，连用两个疗程后改用 ADM（Pharmacia Italia S.P.A）0.01 mg/g，腹腔注射，每 3 周 1 次。

### 1.2 生长曲线及倍增时间测定

分别取生长状态良好的 CT26、CT26/5-Fu/ADM（化疗后 91 d 肿瘤细胞），胰酶消化制备成单细胞悬液，浓度调整 $5\times10^4$ 个/ml，接种到 96 孔板中（每孔 100 μl），于 490 nm 处检测各孔的吸光值（OD 值），连续观察 7 d，实验重复 3 次。以培养时间为横轴，吸光值为纵轴，绘制生长曲线，计算细胞倍增时间。

### 1.3 MTT 法检测化疗前后肿瘤细胞对化疗药物的敏感性

各化疗药物最大浓度为：ADM 1 mg/ml、VCR 10 μg/ml、5-Fu 1 mg/ml、HCPT 0.1 μg/ml、DAM 1 mg/ml、ACT 0.1 mg/ml、VP16 0.01 mg/ml 分别按 10 倍比例稀释成 5 个浓度梯度。MTT 法分别检测 CT26、CT26/5-Fu/ADM 细胞对 ADM、5-Fu、VCR 等药物的敏感性。MTT 法测定肿瘤细胞增值抑制率，计算耐药指数（Resistance index，RI）。

### 1.4 RT-PCR 检测化疗前后肿瘤组织与外周血单个核细胞 MDR1b mRNA 表达

1.4.1 引物设计 引物根据已知的 MDR1b mRNA 序列设计并合成一对扩增引物，PCR 扩增产物 196 bp，上游引物：5-GCC AAA ATA ACA AGG GTT AGC TT-3，下游引物：5-TGC GAC AGC AGA TAG GCT G-3。选用 GAPDH 作内参照，PCR 扩增产物 439 bp，GAPDH 上游引物：5-AGC AGT CCC GTA CAC TGG CAA A-3，GAPDH 下游引物：5-TCT GTA GTG ATG TAA ATG TCC TCT-3。以上引物由重庆鼎国生物科技有限公司合成。

1.4.2 RT-PCR Total RNA 提取试剂 TaKaRa RNAiso Reagent 购于宝生物工程（大连）有限公司，按试剂说明书提取总RNA，紫外光分光光度仪检测总 RNA 含量。ReverTra Ace-α-TM 逆转录试剂盒购于东洋纺（上海）生物科技有限公司。按试剂说明书操作。2 × HotStart TaqPCR master Mix 购于天根生物科技（北京）有限公司。将 MDR1b mRNA 与 GAPDH mRNA 的 PCR 产物的吸光度比值定义为 MDR1b mRNA 的相对强度。

### 1.5 流式检测柔红霉素排出情况

提取化疗前后原代培养的肿瘤细胞 $1\times10^6$ 个/ml，加柔红霉素终浓度 7.5 μg/ml，37℃ 5 % $CO_2$ 培养箱内孵育 30 min，1 500 r/min，弃培养基，无血清的 D/F12 培养基洗 1 次，加异搏定终浓度 10 μg/ml，终止泵功能，孵育 10 min，1 500 r，5 min，弃培养基，加 PBS 1 ml，于流式细胞仪上检测，吸光值 570 nm。

### 1.6 统计学处理

设检验水准 $\alpha=0.05$，统计软件使用 SPSS11.5，两组数据比较，计量资料的 $t$ 检验，$P<0.05$。

## 2 结 果

### 2.1 对照组与实验组肿瘤生长情况

B 超显示对照组开始化疗后第 21 d 肿瘤生长情况，平均肿瘤体积（0.63 ± 0.11）$cm^3$，100 %成瘤，彩超显示肿瘤血供丰富（图 1），第 47 d 时开始出现死亡。实验组于开始化疗后第 21 d B 超未探及肿瘤，化疗后第 35 d B 超显示肿瘤体积（0.48 ± 0.09）$cm^3$。化疗第 49 d，肿瘤体积达到（1.62 ± 0.34）$cm^3$ 时开始生长迅速。小鼠毛发仍较光泽，体重无明显下降，活动度可。化疗后第 91 d 肿瘤体积（8.76 ± 2.17）$cm^3$。化疗第 91 d，小鼠活动度明显降低，包块增大明显，毛发稀疏零乱，肿瘤体积大，不能完整剥离，肉眼可见肿瘤中央明显的出血坏死区域，无 1 例死亡。

### 2.2 生长曲线和倍增时间

横坐标代表天数，纵坐标代表 MTT 测得光密度值，根据公式计算获得化疗前后肿瘤细胞的倍增时间分别为（64.8 ± 4.2）h 和（70.6 ± 5.17）h，（$t=1.2$，$P>0.05$）化疗前后肿瘤细胞倍增时间有差异（图 2）。

### 2.3 MTT 检测未化疗和化疗 91 d 后肿瘤细胞对化疗药物敏感性及对应化疗药物的 RI

由上表可见经过 91 d 的化疗后，阿霉素和放线菌素 D 的 RI 明显升高，分别为 26.4 和 29.3，化疗后的肿瘤组织对这两种药物的敏感性明显降低，5- 氟尿嘧啶的 IR 为 5.8，其

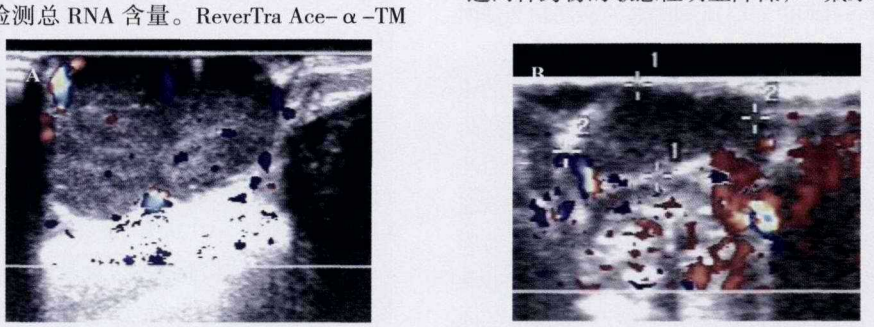



图 1 A 图 B 超显示对照组开始化疗后 21 d 肿瘤早期生长情况，B 图显示其丰富血流信号

他化疗药物的敏感性也降低(表 1)。

2.4 化疗后肿瘤组织 MDR1 mRNA 表达情况

经半定量 PCR 发现,未化疗的肿瘤株 MDR1b mRNA 表达量低,经 5-Fu 和 ADM 化疗诱导后,在 196 bp 处耐药株 MDR1b mRNA 表达明显高于亲本细胞株(图 3)($n$=7,$P$<0.05)。

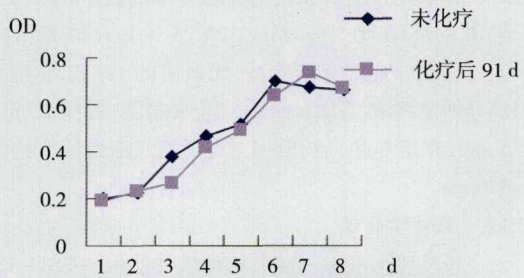
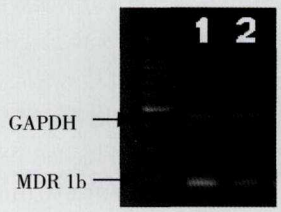



图 2 未化疗组和化疗后 91 d 组肿瘤细胞生长曲线

2.5 流式检测化疗前后肿瘤细胞对柔红霉素的外排功能

亲本细胞株外排结果 1.58% ± 0.45 %,耐药株 10.57% ± 1.06 %,柔红霉素排除试验证实化疗后肿瘤组织对柔红霉素的外排能力明显高于未化疗组,差异有统计学意义($n$=7,$P$<0.05)。




1 为耐药株,2 为亲本细胞株

图 3 耐药株和亲本肿瘤细胞 MDR1b mRNA 电泳结果

表 1 化疗前后肿瘤细胞对化疗药物敏感性及 RI

| Drugs | $IC_{50}$( μ g/ml, $\bar{x} \pm s$) | | IR |
|---|---|---|---|
| | 未化疗 $IC_{50}$ | 化疗后 91 d $IC_{50}$ | |
| ADM | 0.167 ± 0.015 | 4.487 ± 0.021 | 26.4 |
| 5-Fu | 0.131 ± 0.023 | 0.762 ± 0.035 | 5.8 |
| DAM | 0.063 ± 0.007 | 0.190 ± 0.011 | 3.0 |
| VP16 | 0.041 ± 0.000 | 0.115 ± 0.009 | 2.8 |
| ACT | 0.004 ± 0.000 | 0.117 ± 0.000 | 29.3 |
| HCPT | 0.071 ± 0.019 | 0.495 ± 0.047 | 7.0 |
| VCR | 0.192 ± 0.004 | 2.086 ± 0.021 | 10.9 |

## 3 讨 论

了解 MRI 对临床如何提高化疗药物疗效有重要意义,目前关于肿瘤多药耐药模型的建立常见有以下几种方法:(1)体外包括化疗药物大剂量筛选和浓度递增诱导法,A M Calcagno 等采用 14 ~ 21 nmol/L 的阿霉素诱导乳腺癌卵巢癌及结肠癌(MCF-7, IGROV-1 and S-1) 仅 10 d, 耐药蛋白 ABCG2 在 mRNA 及蛋白水平都表达增加[5]。(2)体内建模则是将肿瘤细胞接种于动物体内,并给予低剂量的化疗药物刺激,将肿瘤细胞经过多次转种传代后获得耐药株。王熙才等利用 balb/c 小鼠,腹腔接种 S-180 瘤细胞建成小鼠肿瘤动物模型,在低剂量阿霉素腹腔注射治疗下,经过 15 个周期的培育传代,获得了耐药的肿瘤细胞株 S-180R[6]。(3)借助载体直接将耐药基因转入肿瘤细胞,其 MDR1 mRNA 及耐药蛋白表达上调。

以上方法都能获得相应的耐药株,肿瘤与化疗药物的相互作用所产生的继发耐药问题与化疗药物有关,但是化疗药物在机体的吸收、代谢与分布都是有一定差异的,其代谢产物及对各器官的影响与肿瘤的耐药是否有一定联系,肿瘤在发生发展及化疗过程中机体的免疫器官、各种免疫细胞对肿瘤影响及其本身的变化与肿瘤耐药是否有联系,如何逆转肿瘤的耐药问题,及提高化疗效果等是肿瘤化疗需要解决的问题。因此建立体内动物耐药模型有其重要意义。Zhongyun Dong 等于 1994 研究将 CT26 结肠癌接种小鼠在皮下及肺部,用常规剂量 ADM 化疗后 21 d 检测发现,肿瘤 MDR1 mRNA 表达水平提高[7]。

目前国内外建立鼠移植瘤模型给予的细胞数一般给予 $10^6 \sim 10^7$ 个活细胞/只,艾氏腹水癌及 S180 腹水癌移植模型小鼠平均寿命 11 ~ 17 d,其存活期较短,体内建立耐药模型需将肿瘤细胞经过多次转种传代后获得耐药株。615 小鼠可移植性肝癌模型采用腋下接种其宿主存活期为(62.2 ± 11) d,移植成功率为 85.6%,同种移植到小鼠 DBA/1、DBA/2、C3H/hems 等 12 种小鼠无 1 例生长肿瘤,它是 615 小鼠的同基因型肿瘤[8]。本课题在保证肿瘤接种后 100%成瘤率的基础上减少起始接种细胞数($5 \times 10^5$ 个/只),采用皮下接种,经过 91 d 的联合化疗后,无 1 例死亡,增加化疗疗程及延长了小鼠的存活期。

生长曲线测定结果证实,CT26/5-Fu/ADM 细胞株较亲本细胞增殖速度减慢,分裂高峰后移。据 Snow 等[9]耐药标准:RI 小于 5 是低度耐药,5 ~ 15 是中度耐药, 大于 15 是高度耐药。ADM、ACT 高度耐药,HCPT、5-Fu、VCR 中度耐药,DAM、VP16 低度耐药。CT26/5-Fu/ADM 细胞株在含 ADM(终浓度为 0.5 μ g/ml) 的培养基中并保持 90%以上的细胞存活率的情况下能正常地传代、冻存、复苏,表明其耐药性稳定。其中对 ACT 的 RI 最高,为 29.3。ACT 分子中有两个等位的环状

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)08-1227-05

# LMP-1 与 LMP-3 真核双表达质粒的构建及体外表达

唐春晖,倪卫东,高仕长
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建真核双表达质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3,并检测其在体外的表达。方法:采用人工设计合成人 LIM 矿化蛋白 -1(LIM mineralization protein-1,LMP-1)和 LIM 矿化蛋白 -3(LIM mineralization protein-3,LMP-3)基因片段,分别连接于中介质粒 Puc57,经酶切、测序鉴定后,LMP-1 和 pBudCE4.1 先连接,经酶切鉴定,再连接 LMP-3,重组双表达质粒行酶切、测序鉴定。用脂质体包裹转染骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs),按转染情况分为 5 组:未转染组(A 组)、转染空载体组(B 组)、转染 LMP-1 基因组(C 组)、转染 LMP-3 基因组(D 组)、转染 LMP-1 和 LMP-3 双基因组(E 组)。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 LMP-1 和 LMP-3 的表达。结果:酶切及测序证实质粒 Puc57-LMP-1、Puc57-LMP-3 及其 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 真核双表达质粒构建成功。该双表达质粒在体外转染骨髓 MSCs 后可表达 LMP-1 和 LMP-3 分子。对 RT-PCR 及 Western blot 检测结果行灰度值测量显示:LMP-1 mRNA 及蛋白水平的表达,A、B 组与 C、D、E 组间差异有统计学意义($P<0.05$),C 组与 E 组差异无统计学意义($P>0.05$);LMP-3 mRNA 及蛋白水平的表达,A、B 组与 C、D、E 组间差异有统计学意义($P<0.001$),D 组与 E 组差异有统计学意义($P<0.05$),C 组及 D 组在 LMP-1 及 LMP-3 的表达上的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:成功构建真核双表达质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3,证实转染的骨髓 MSCs 能在体外同时表达 LMP-1 和 -LMP-3 分子。

【关键词】LIM 矿化蛋白 -1;LIM 矿化蛋白 -3;质粒 Puc57;质粒 pBudCE4.1;间充质干细胞
【中国图书分类法分类号】R683.42 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-25

# Construction of co-expression plasmid pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 and its expression in vitro

*TANG Chun-hui, et al*
(*Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the mammalian CO-expression plasmid pBudCE4.1- LMP-1-LMP-3, and to detect the expression of the plasmid in vitro. *Methods*: Fragments of LMP-1 gene and Fragments of LMP-3 gene were gained from the Company, and were constructed respectively into the plasmid vector Puc57, The

作者介绍:唐春晖(1978- ),男,主治医师,硕士,研究方向:骨折创伤。
通讯作者:倪卫东,男,教授,E-mail:niweidong18@163.com。

肽链,此肽链可与 DNA 分子的脱氧鸟嘌呤发挥特异性相互作用,使 ACT 嵌入 DNA 双螺旋的小沟中,与 DNA 形成复合体,阻碍 RNA 多聚酶的功能,抑制 RNA 的合成,特别是 mRNA 的合成。ADM 抗肿瘤作用机理主要是嵌入 DNA 而抑制核酸的合成,两者抗肿瘤具有相似的作用机理,考虑 ADM 与 ACT 形成交叉耐药,因此 RI 最高。RT-PCR 检测示耐药细胞 MDR1b mRNA 表达是亲本细胞的 2.8 倍。流式细胞术检测发现耐药细胞 P-gp 是亲本细胞排出药物的能力的 6.7 倍。本动物模型可用于化疗后肿瘤继发性耐药机制、了解体内各器官变化及多药耐药逆转机制研究。

## 参 考 文 献

[1] Bush JA, Li G.Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and Multidrug resistance[J].Int J Cancer, 2002, 98(3): 323-330.
[2] Ueda K, Yoshida A, Amachi T, et al.Recent progress in p-glycoprorein research[J].Ami cancer Drug Res, 2002, 14(2): 115-121.
[3] Han K, Kahng J, Kim M, et al. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia[J].Acta Haematol, 2000, 104(4): 174-180.
[4] Diestra J E, Condom E, Del Muro X G, et al. Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications [J].J Urol, 2003, 170(4): 1383-1387.
[5] A M Calcagno, J M Fostel, K K W To, et al.Single-step doxorubicin -selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes[J]. British Journal of Cancer, 2008, 98: 1515-1524.
[6] 王熙才,蒋永新,伍治平,等.恶性肿瘤化疗多药耐药动物模型的实验研究[J].临床肿瘤学杂志,2006,11(4):283-285.
[7] Dong Z, Radinsky R, Fan D, et al.Organ specific modulation of steady-state mdr gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells[J].Journal of the National Cancer Institute, 1994, 86(12): 913 -920.
[8] 范维珂.现代肿瘤学基础[M].北京:人民卫生出版社,2005.217 -218.
[9] Snow K, Judd W.Characterization of adriamycin and amsacrineresistant human leukaemic T cell lines[J].British Journal of Cancer, 1991, 63(1): 17-28.

(责任编辑:关蕴良)