基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0054-03

多药耐药口腔腺样囊性癌细胞株(Acc-3/CDDP)的建立及其细胞中相关耐药基因表达的变化

张福军,季 平,杨 凯,李雅冬
(重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:采用细胞毒性化疗药物顺铂(Cisplatin,CDDP)诱导口腔腺样囊性癌 Acc-3 细胞系,得到耐药表型的细胞亚系 Acc-3/CDDP,检测其多药耐药性、探讨与其亲代 Acc-3 细胞系的耐药相关基因变化。方法:用浓度递增法建立 Acc-3/CDDP 耐药细胞系;用 MTT 法检测 Acc-3/CDDP 细胞的耐药指数,RT-PCR 检测多药耐药基因 MDR-1、MRP-1、GST-π 和 Bcl-2 基因的 mRNA 表达水平。结果:Acc-3/CDDP 对 CDDP、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、长春新碱(VCR)、氨甲喋呤(MTX)和平阳霉素(PYM)的耐药指数(Resistance factor,RF)分别为 8.9、1.97、2.83、2.42、1.1;RT-PCR 显示:Acc-3/CDDP 中 MRP-1、GST-π、Bcl-2 较 Acc-3 升高,Acc-3/CDDP 中有 MDR-1 基因表达,而 Acc-3 中无 MDR-1 基因表达。结论:MRP-1、GST-π、Bcl-2 基因的表达水平在多药耐药口腔腺样囊性癌 Acc-3/CDDP 细胞中显著升高,这为进一步探讨肿瘤多药耐药的形成机制提供了科学基础。

【关键词】口腔;腺样囊性癌细胞;多药耐药;基因
【中国图书分类法分类号】R739.87 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-16

Establishment and drug-resistance gene expression of cisplatin-resistant cell line Acc-3/CDDP

ZHANG Fu-Jun, et al
(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a CDDP-resistant cell line from human oral adenoid cystic carcinoma cell line Acc-3 and compare the drug-resistance gene expression between them. *Method*: The CDDP-resistant cell line Acc-3/CDDP was established by increasing the concentration of CDDP added to Acc-3 cells step wisely. The index of drug-resistance was estimated by MTT assay. The expression of MDR-1, MRP-1, GST-π and Bcl-2 were measured by RT-PCR optical density OD. *Result*: The resistance factors($RF=IC_{50}$(Acc-3/CDDP)/IC_{50}(Acc-3)) for CDDP, 5-Fu, VCR, MTX and PYM were 8.9, 1.97, 2.83, 2.42, 1.1 respectively. The expression of drug-resistance gene MRP-1, GST-π and Bcl-2 increased in Acc-3/CDDP cells. MDR-1 was expressed in Acc-3/CDDP, but none in Acc-3. *Conclusion*: MDR-1, MRP-1, GST-π and Bcl-2 were significantly over expressed in CDDP-resistant cell line Acc-3/CDDP, which can provide effective models for the study on multi-drug resistance of oral carcinoma.

【Key words】Oral cavity; Adenoid cystic carcinoma cell; Multi-drug resistance; Gene

化疗是口腔颌面部肿瘤综合治疗的重要组成部分。影响化疗效果的因素很多,肿瘤细胞的多药耐药就是其中重要因素之一。研究肿瘤细胞多药耐药产生的机制,克服肿瘤细胞的耐药性,从而提高化疗效果,是口腔颌面肿瘤研究的热点和重点问题。本文采用细胞毒性化疗药物顺铂(Cisplatin,CDDP)诱导 Acc-3 细胞系耐药,得到耐药表型的细胞亚系 Acc-3/CDDP,检测其多药耐药性、并探讨其与亲代 Acc-3 细胞系的相关耐药基因表达水平的变化,为探讨肿瘤细胞多药耐药的形成机制及提高临床治疗疗效提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及主要试剂

口腔腺样囊性癌 ACC-3 细胞株(武汉中国典型培养物保藏中心提供),顺铂(Cisplatin,CDDP)(山东德州德药制药有限公司),氨甲喋呤(Methotrexate,MTX)(上海华联制药厂),5-氟尿嘧啶(Fluorouracil,5-Fu)(济南齐鲁制药厂),平阳霉素(Pingyangmycin,PYM)(哈尔滨博莱制药有限公司),长春新碱(Vincristine,VCR)(上海第二军医大学朝晖制药厂),

作者介绍:张福军(1970-),男,主治医师,硕士,研究方向:口腔颌面肿瘤的诊治。
通讯作者:杨 凯,男,教授,E-mail: cqfyyk@yahoo.com.cn。

RPMI1640 细胞培养基、四唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazo-diumbromide,MTT)(美国 Gibco 公司),免疫组化试剂盒、PCR 反应试剂盒(美国 Zymed 公司),看家基因GAPDH 标准品(上海复旦悦达生物技术有限公司自制,批号 040326),看家基因 GAPDH 引物、靶基因引物(上海中科开瑞生物芯片股份有限公司合成)。

1.2 细胞培养与 Acc-3 细胞株耐药性诱导

取 Acc-3 对数生长期细胞在 37℃、5%CO_2 条件下,置于 RPMI1640 培养液中(含 10%小牛血清,谷胺酰胺 300 mg/L,丙酮酸钠 110 mg/L,青霉素、链霉素各 200 U/ml)培养。在含 0.3 μg/ml CDDP 浓度的培养液中培养 3 d 后,更换正常培养液培养 7 d,待细胞生长成片,递增 CDDP 剂量,间歇性加药,连续诱导 10 月,直到 Acc-3 细胞能够维持在 7.5 μg/ml CDDP 浓度下正常生长即成为耐药的人腺样囊性癌细胞 Acc-3/CDDP。

1.3 生长曲线测定

取对数生长期的 Acc-3 和 Acc-3/CDDP 单细胞悬液按每孔 1 ml(密度 10^5 个 /ml)接种到 24 孔培养板中,37℃,5%CO_2 饱和湿度培养,每 24 h 取 3 孔细胞进行计数,直至细胞数有明显减少为止,连续观察 8 d。以培养时间为横轴,细胞数为纵轴(对数),描绘在半对数坐标纸上,绘制生长曲线。据 Patterson 公式计算细胞在对数生长期的倍增时间:Td=T×lg2/lg(Nt/No)[Td:倍增时间(h);T:细胞数由 No 增至 Nt 所用时间;N:细胞数]。

1.4 MTT 法检测 Acc-3/CDDP 与 Acc-3 细胞系的 IC_{50}

取对数生长期的 Acc-3 和 Acc-3/CDDP 细胞接种到 96 孔培养板中(每孔 200 μl),37℃,5%CO_2 下培养。培养 24 h 后参照化疗药物血药峰浓度和预实验加入不同浓度的 MTX、CDDP、5-Fu、PYM 和 VCR(设 3 个复孔),同时设无药对照组和空白对照组。药物作用 24 h 后在待测的孔中加入 MTT 液(5 mg/ml)20 μl,继续培养。酶联免疫检测仪检测每孔 OD 值,波长 480 nm。各测试孔 OD 值减去本底 OD 值(空白对照组 OD 值)为实际 OD 值。耐药指数(RF)= 耐药细胞系的 IC_{50}/ 亲本细胞的 IC_{50}。

1.5 RT-PCR 法检测耐药相关基因表达

利用 RNA 提取试剂盒,分别提取 Acc-3 和 Acc-3/CDDP 的总 RNA,检测多药耐药基因(Multi-drug resistance,MDR-1)、(Multidrug resistance associated protein,MRP-1)、(Glutathione s-transferase-π,GST-π)和 Bcl-2 基因的表达。引物的设计与合成以 Gene Bank MDR-1、MRP-1、GST-π、Bcl-2 基因序列为模板,由上海生工设计合成。

MDR-1:上游 5'-ACTGAGCCTGGAGGTGAAGA-3';下游 5'-CCACCAGAGAGCTGAGTTCC-3'。MRP:上游 5'-ACCAAGACGTATCAGGTGGC-3';下游 5'-CTGTCAGGTTCCAGCTCCTC-3'。GST-π:上游 5'-GGAGACCTCACCCTGTACCA-3';下游 5'-GGCTAGGACCTCATGGATCA-3'。Bcl-2:上游 5'-GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA-3';下游 5'-AGGCACCCAGGGTGATGCAA-3'。PCR 反应在 FTC2000 型荧光定量 PCR 仪上进行。

2 结 果

2.1 多药耐药细胞 Acc-3/CDDP 系的建立

铺满瓶的 Acc-3 细胞经顺铂(0.3 μg/ml)作用后细胞胞体增大、形态变异、胞质粗糙、胞内颗粒堆积,绝大部分细胞悬浮死亡,1~3 个月后偶见 1~2 个细胞集落形成,将其培养传代扩增,再递增药物浓度,经 10 个月时间获得耐 CDDP 的口腔腺样囊性癌细胞株(Acc-3/CDDP),其耐 CDDP 浓度为 7.5 μg/ml,见图 1。

2.2 Acc-3/CDDP 的生长曲线和倍增时间

Acc-3 和 Acc-3/CDDP 细胞生长曲线见图 2,Acc-3 细胞生长较 Acc-3/CDDP 生长快,接种后第 7 d 达到平台期。根据 Patterson 公式得到 Acc-3 和 Acc-3/CDDP 细胞的倍增时间分别为 38.75 h、40.29 h。

2.3 MTT 法检测结果

对顺铂 IC_{50} 为 7.5 μg/ml,耐药指数(Resistancefactor,RF)为 8.9;对 5-Fu 的 IC_{50} 为 0.86 μg/ml,RF 为 1.97;对长春新碱的 IC_{50} 为 0.95 μg/ml,RF 为 2.83;对氨甲喋呤的 IC_{50} 为 2.17 μg/ml,RF 为 2.42;以上药物的耐药性明显。对平阳霉素 IC_{50} 为 2.48 μg/ml,RF 为 1.1,耐药性不明显。

2.4 RT-PCR 结果

Acc-3 和 Acc-3/CDDP 细胞总 RNA 的提取电泳结果见图 3,由图 3 可见:28S、18S 和 5S 条带清晰,说明所提 RNA 质量较好。分光光度计检测纯度(A_{260}/A_{280})在 1.8~2.0,说明所提 RNA 纯度较高。

RT—PCR 扩增产物的电泳结果见图 4。由图 4 可以看出,Acc-3/CDDP 中 MRP-1、GST-π、Bcl-2 较 Acc-3 升高,MRP-1 光密度比值 Acc-3/CDDP:Acc-3= 5.334:1.111=4.8 倍;GST-π 光密度比值 Acc-3/CDDP:Acc-3=2.315:1.157=2 倍;Bcl-2 光密度比值 Acc-3/CDDP:Acc-3 =0.932:0.516=1.8 倍。Acc-3/CDDP 中有 MDR-1 基因表达,而 Acc-3 细胞中无 MDR-1 基因表达。

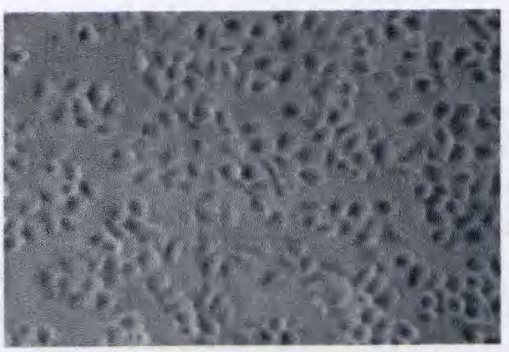


图 1 Acc-3/CDDP 细胞系

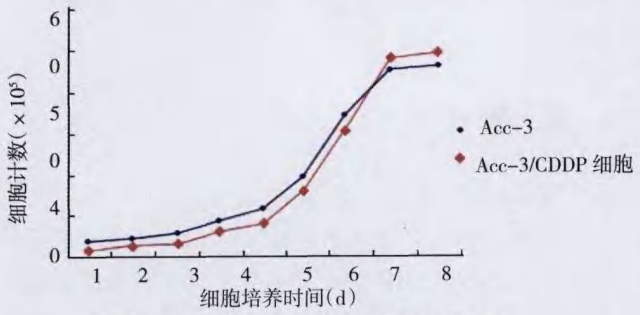


图 2　Acc-3 和 Acc-3/CDDP 细胞生长曲线

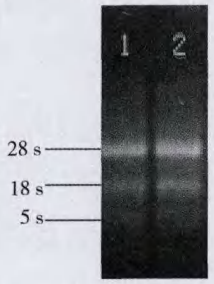
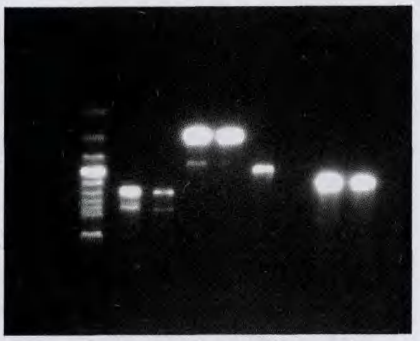


图 3　RNA 抽提 1%琼脂糖凝胶电泳图



0. empty; M. ϕX174-Hine II digest DNA Marker(TaKaRa);
1. Acc-3/CDDP GST-π(342bp); 2. Acc-3 GST-π(342bp);
3. Acc-3/CDDP MRP-1(456bp); 4. Acc-3 MRP-1(456bp);
5. Acc-3/CDDP MDR-1(396bp); 6. Acc-3 MDR-1(396bp);
7. Acc-3/CDDP Bcl-2(352bp); 8. Acc-3 Bcl-2(352bp)

图 4　RT-PCR 扩增 GST-π、MRP-1、MDR-1、Bcl-2 的电泳

3　讨　论

多药耐药(Multi-drug resistance, MDR)是指肿瘤细胞经过或不经过药物诱导，对 2 种或 2 种以上不同结构和作用机制的药物产生耐药的现象，耐药现象在临床上非常普遍[1-4]。顺铂(CDDP)是一种广谱、高效的抗癌药物，被认为是针对涎腺腺样囊性癌的有效药物之一，但随着临床研究的不断深入，越来越多的资料结果显示以顺铂为主的化疗方案对涎腺腺样囊性癌患者的总体生存率无明显改善，肿瘤细胞对 CDDP 的耐药是导致化疗失败的最直接和最重要的原因之一。为了解口腔腺样囊性癌细胞的耐药机制和制定逆转耐药策略，我们采用顺铂诱导，体外培养建立一株人口腔腺样囊性癌耐药细胞系 ACC-3/CDDP。本研究采用 MTT 法证明：ACC-3/CDDP 细胞株不但对 CDDP 产生了耐药性，同时对 5-Fu、VCR、MTX 化疗药物也产生了较强的耐药性。

国内外诱导耐药细胞株多采用浓度递增法进行[5]，即从低浓度开始，逐渐加大药物浓度，持续作用的方法诱导。本研究采用顺铂浓度递增间歇诱导法对 Acc-3 细胞系进行诱导，经过不断调整诱导药物的浓度，改变培养条件，成功建立了口腔腺样囊性癌耐药细胞系 Acc-3/CDDP，当诱导浓度为 7.5 μg/ml 时，耐药指数为 8.9 倍。

为了观察耐药细胞系 ACC-3/CDDP 的形成与相关耐药基因表达变化的关系。本研究以 RT-PCR 方法检测了 MRP-1、MDR-1、GST-π 和 Bcl-2 相关耐药基因在 Acc-3/CDDP 及亲本细胞中的表达情况，结果显示：Acc-3/CDDP 细胞中 MRP-1、GST-π、Bcl-2 基因较 Acc-3 中表达升高，Acc-3/CDDP 中有 MDR-1 基因表达，而 Acc-3 细胞中无 MDR-1 基因表达。既往研究较多且发生机制已趋于明了的是 P-gap 介导的 MDR-1，研究发现肿瘤细胞中 MDR-1 基因过度表达产生大量 P-gap 导致的耐药是多药耐药的主要机理[6,7]。非 P-gap 介导的 MDR (Bcl-2)正成为当今耐药研究领域的又一大热点[8,9]。

本研究成功建立了 ACC-3 顺铂耐药口腔腺样囊性癌 Acc-3/CDDP 系，为进一步探讨肿瘤细胞多药耐药形成的机制，研究有效的多药耐药逆转方法具有重要意义。

参　考　文　献

[1] Wittig R, Nessling M, Will R D, et al. Candidate genes for cross-resistance against DNA-damaging drugs[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6698-6705.

[2] Locke V L, Davey R A, Davey M W. Modulation of drug and radiation resistance in small cell lung cancer cells by paclitaxel[J]. Anticancer Drugs, 2003, 14(7): 523-531.

[3] Plasschaert S L, van der Kolk D M, de Bont E S, et al. The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(14): 5171-5177.

[4] Fojo T, Bates S. Strategies for reversing drug resistance[J]. Oncogene, 2003, 22(47): 7512-7523.

[5] Chu J J, Chiang C D, Rao C S, et al. Establishment and characterization of a pacitaxel-resistant human non-small cell lung cancer cell line [J]. Anticancer Res, 2000, 20(4): 2449.

[6] 王　佚，金先庆，王　珊. 多药耐药 mdr-1 基因体外转染兔骨髓造血细胞及其表达与功能的研究[J]. 重庆医科大学学报，2003，28(4)：409-413.

[7] 王萍玲，胡丽娜，邓凯贤，等. RNA 干扰沉默 mdr-1 基因联合阿霉素对卵巢癌耐药细胞株 SKOV3/ADM 增殖的抑制作用[J]. 重庆医科大学学报，2005，30(2)：232-235.

[8] 杨　凯，温玉明，王　莉，等. 术前诱导化疗与口腔鳞癌多药耐药基因表达关系的研究[J]. 临床口腔医学杂志，2002，18(5)：332-333.

[9] 刘贤奎，孔垂泽，时　京. 转染 Bcl-2 基因的膀胱癌细胞多药耐药性研究[J]. 中华肿瘤预防杂志，2006，13(15)：1151-1153，1162.

（责任编辑：冉明会）