维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0601－04

人肝肿瘤耐药细胞亚系建立及生物学特性研究

罗诗樵，罗亿治

(重庆医科大学临床学院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:以阿霉素(DOX)诱导建立人肝肿瘤细胞系 HepG2 的多药耐药亚系 HepG2/DOX,并对 HepG2/DOX 的生物学特性及耐药机制进行研究。方法:以浓度梯度递增方法,用 DOX 诱导 HepG2 产生耐药性。显微镜观察细胞形态,绘制生长曲线,作染色体常规及 G 带分析。MTT 法检测 HepG2、HepG2/DOX 细胞对抗癌药物的敏感性。应用免疫组化法检测 MDR－1 基因产物 PgP 的表达。结果:HepG2/DOX 与 HepG2 在形态上染色体数目和结构均有差异。细胞可在 DOX 浓度为 0.1μg/ml 培养基内生长,但生长速度减慢。DOX、顺铂(CDDP)、丝裂霉素(MMC)、氟脲嘧啶(5－FU)、氨甲喋呤(MTX)对 HepG2、HepG2/DOX 细胞的 IC50 值(μg/ml)分别为(0.070 和 1.161)、(0.214 和 1.317)、(0.162 和 0.498)、(0.313 和 1683)、(0.007 和 0.217)。HepG2/DOX 细胞 PgP 表达增高。在无 DOX 培养基内生长 5 周后,DOX 对 HepG2/DOX 的 IC50 值(μg/ml)为 0.684。结论:HepG2/DOX 有多药耐药的特点,其耐药性与 Pgp 的表达增高及倍增时间延长有关。

【关键词】肝肿瘤;多药耐药;细胞系

【中国图书分类法分类号】R735.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－11－28

Establishment of multidrug resistant hepatoma cell subline and its biological features

LUO Shiqiao, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish multidrug resistant human hepatoma cell subline(HepG2/DOX) and study its biological features. *Methods*: Doxorubincin－resistant human hepatoma cell subline (HepG2/DOX) was induced by doxorubincin－gradually increasing concentration. To observe cells by light microscope and analyze number and structure of chromosomes of these tumor cells. Sensitivity of anticancer drugs was screened in HepG2, HepG2/DOX cells by MTT method. The immunohistochemistry method was used to measure MDR－1 gene product Pgp expression. *Results*: HepG2/DOX and HepG2 were different in shape, growth speed. The number and structure of their chromosomes were also different. The value of 50% inhibitory concentration(IC50, μg/ml) for DOX, CDDP, MMC, 5－FU, and MTX in HepG2, HepG2/DOX cells was (0.070 and 1.161), (0.214 and 1.317), (0.162 and 0.498), (0.313 and 1.683), (0,007 and 0.217) respectively. MDR－1 gene product Pgp170 expression was found either in HepG2/DOX or HepG2 cells. Pgp170 exprssion in HepG2/DOX was higher than in HepG2. Once HepG2/DOX had been cultured in DOX free RPMI1640 medium for 5 weeks, the IC50(μg/ml) for DOX in HepG2/DOX reduced to 0.684. *Conclusion*: HepG2/DOX has the characteristics of MDR. The drug－resistance was correlated with over expression of MDR－1 gene product Pgp 170 and slow growth.

【Key words】Liver neoplasma; Multidrug resistance; Cell line

肿瘤细胞接触一种抗癌药物,对此种抗癌药物产生耐药后,对多种结构和药理作用不同的抗癌药物也产生耐药性即多药耐药(MDR, Multidrug Resistance)[1,2]。多药耐药是化疗失败的重要原因之一。在多药耐药机制及逆转研究中多药耐药细胞系的建立显得非常重要[3,4]。本文报道人肝肿瘤细胞系 HepG2 多药耐药亚系 HepG2/DOX 建立过程及生物学特性。初步探讨 HepG2/DOX MDR 产生的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝肿瘤细胞系 HepG2[6]:由重庆医科大学第二临床学院病毒性肝炎研究所提供。人肺腺癌细胞系 A549[7]:由重庆医科大学临床生化教研室惠赠。DOX: FARMITALIA. CARIO. ERBA; CDDP: 山东齐鲁制药厂; MMC: KYOWA.

作者介绍:罗诗樵(1971－),男,主治医师,博士,主要研究方向:肝脏疾病和器官移植。

维普资讯 http://www.cqvip.com

HAKKO. KOGYO. ,CO,LTD;5－Fu:上海旭东海普药业有限公司;MTX:上海第十二制药厂;免疫组化试剂均购自福州迈新生物技术开发公司抗 PgP－170 单克隆抗体(JSB－1);s－p 免疫组化染色试剂盒;DAB 显色试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞贴壁培养于 RPMI－1640 培养液(含 10% 小牛血清,10mmol/L Hepes,100U/ml 青霉素,100μg/ml 链霉素)内,37℃,5% CO_2 孵箱培养。

1.2.2 HepG2 多药耐药亚系的诱导过程

取对数生长期的 HepG2 细胞,加入不同浓度的 DOX,置于 37℃,5% CO_2 孵箱持续培养。当 DOX 浓度≥0.05μg/ml 时,HepG2 细胞增殖停滞,细胞变形、肿胀破裂,经 3～4 周后全部浮起。而 DOX 浓度＝0.01μg/ml 时,仍有部分细胞能在培养液中增殖,但细胞肿胀,胞内颗粒增多。当 DOX 浓度≤0.005μg/ml 时,细胞的生长增殖所受影响较小。以含 DOX0.01μg/ml 的完全 RPMI1640 培养液持续培养细胞,多数细胞死亡浮起,少数细胞增长极慢。更换不含 DOX 的培养液,使细胞生长增殖,传代后,又加入 DOX,使其浓度为 0.01μg/ml,待细胞在 DOX 浓度 0.01μg/ml 时能增殖,细胞快融合时,将 DOX 浓度提高为 0.02μg/ml,持续培养 1 周,仍有少数细胞存活,更换不含 DOX 之培养液,使细胞增殖,传代后,再加入 DOX 浓度为 0.02μg/ml。重复以上步骤,DOX 浓度逐级递增。6 月后,细胞能在 DOX 浓度为 0.1μg/ml 时,生长增殖传代。命名为 HepG2/DOX。

1.2.3 形态学检查

培养中 HepG2 与 HepG2/DOX,倒置显微镜下观察。

1.2.4 细胞生长曲线测定

细胞浓度为 5×10^4/ml,接种于 24 孔板。37℃,5% CO_2 孵箱中培养。自第 2～6 天各计数三孔细胞数,取均值,绘制时间—细胞数曲线。计算细胞在对数生长期的倍增时间 DT＝TIg2/Ig(N/NO)[8]

1.2.5 染色体分析

染色体显示及显 G 带参见文献[5]

1.2.6 药物敏感性试验

MTT 法检测细胞的药物敏感性,方法参照文献[9],并稍作改进。

HepG2、HepG2/DOX 细胞浓度为 3×10^4/ml,接种于 96 孔板,每孔 200μl,加入不同浓度的抗癌药物,每浓度重复 3 孔。37℃,5% CO_2 孵箱中培养。48h 后,加入 5mg/mlMTT 15μl,放回孵箱。4h 后,吸取上清,加 200μl 二甲亚砜,振荡 5min。波长 570nm,读取吸光度值。以不含细胞 RPMI 1640 培养液作对照,其余操作同有细胞孔的操作。绘制剂量反应曲线。以直线回归法推算药物半数抑制浓度 IC50。细胞抑制率＝1－(A_x－A)/(A_0－A)

A_x 加药孔吸光度值;A 对照孔吸光度值;A_0 不加药物孔的吸光度值

1.2.7 细胞 PgP 表达的免疫组化检测

方法参考试剂盒操作步骤,稍作改进。免疫组化结果判定:Pgp 以细胞膜、细胞浆出现棕黄色颗粒状着色为阳性,未着色为阴性,根据着色强度分为三级:弱＋(棕黄色染色),中＋＋(深棕色染色),强＋＋＋(深棕色染色,成斑块状遍布整个细胞)。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以人肺癌细胞 A549 作 PgP 的阳性对照[7]。

1.2.8 统计学处理

两样本均数的 t 检验,u 检验,直线回归数据均用 SAS 6.0 软件处理,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 细胞形态

光镜下可见 HepG2 形态为多角形大小一致,HepG2/DOX 形态大小不一致,梭形细胞多见。

2.2 细胞生长曲线

HepG2/DOX 生长速度较 HepG2 慢,其倍增时间为 47.2±1.97h,HepG2 的倍增时间为 23.3±0.79h,两者差异有显著性意义($P<0.01$)。(见图 3)

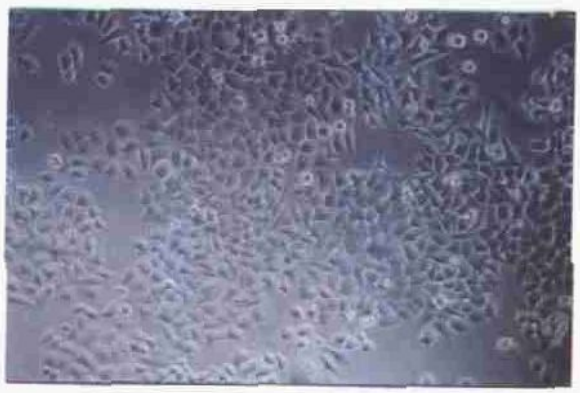


图 1 贴壁生长的 HepG2,×100



图 2 贴壁生长的 HepG2/DOX,×100

维普资讯 http://www.cqvip.com

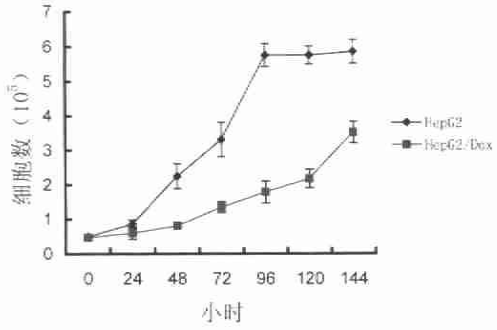


图 3 HepG2、HepG2/DOX 细胞生长曲线

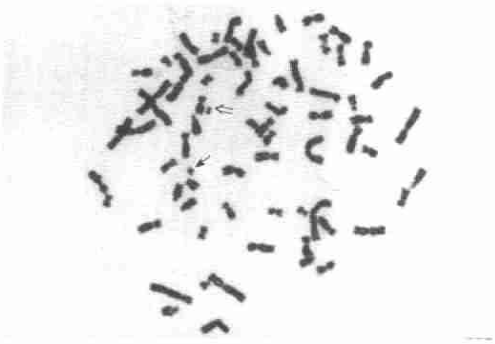


图 4 HepG2 74 条染色体

↑小 G,△小 F,×100

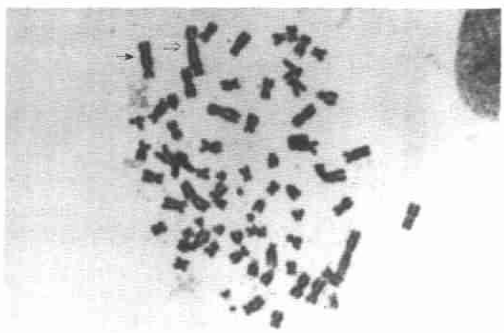


图 5 HepG2/DOX 69 条染色体

↑大 B,△双着丝粒,×100

2.3 染色体分析

对 HeG2 及 HepG2/DOX 进行染色体分析,各计数 200 个分裂相细胞。

染色体数目比较

表 1 HepG2、HepG2/DOX 染色体数目比较

	细胞数	染色体数目(X)						
		$\bar{x}$	<46	46-64	65-67	68-70	71-74	>74
HepG2	200	72	0	4	6	6	180	4
HepG2/DOX	200	68*	2	6	16	172	4	0

* $P<0.05$,HepG2 和 HepG2/DOX 的染色体平均数目有显著性差异。

染色体结构分析

HepG2 85%的细胞均带有一条小 G 组和小 F 细胞畸变染色体。

HepG2/DOX 70%的细胞均带有一条大的 B 组畸变染色体;20%的细胞带有一条大的双着丝粒畸变染色体。

2.4 HepG2,HepG2/DOX 药物敏感性,各药物的 IC50(μg/ml)

表 2 抗癌药物对 HepG2,HepG2/DOX IC50 值(μg/ml)

	IC50				
	DOX	CDDP	MMC	5-FU	MTX
HepG2	0.070	0.214	0.162	0.322	0.007
HepG2/DOX	1.161	1.317	0.499	1.684	0.083
*	0.684	—	—	—	—

* 在无 DOX 的 RPMI1640 中培养 5 周后的 HepG2/DOX

HepG2/DOX 对 DOX、CDDP、MMC、5-FU 和 MTX 的耐药倍数为 HepG2 的 16.6 倍、6.2 倍、3.1 倍、5.4 倍和 11.6 倍。在无 DOX 的 RPMI1640 中培养五周后,HepG2/DOX 对 DOX 的耐药倍数有所下降,为 9.8 倍。

2.5 免疫组化检测结果

HepG2/DOXPgp(+++~++++),HepG2 Pgp(+),A549 细胞 PgP 为(++)[7]。

3 讨 论

据文献报告已有多种实体瘤细胞系及白血病 MDR 细胞系建立成功[10~15]。MDR 肿瘤细胞系的培养多是将亲本细胞在体外传代培养时加入抗癌药物进行人为诱导,诱导方式为浓度梯度递增法[12],短时间高浓度冲击法[13],或者以上两种方法混合使用[10]。也有不用抗癌药物诱导而采用将 Pgp cDNA 序列转染给药物细胞来建立 MDR 细胞系的[18]。应用浓度梯度递增法以 DOX 体外诱导人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 产生 MDR 亚系 HepG2/DOX,不仅对 DOX 产生耐药,而且对从未接触过的 CDDP、MMC、5-FU、MTX 几种结构及作用机理不同的药物也产生了不同程度的耐药。对耐药程度的评价目前尚无定论,K. Snow 和 W. Judd 认为耐药倍数小于 5 倍是低度耐药,耐药倍数 5~15 倍为中等耐药,耐药倍数大于 20 倍为高度耐药[15]。按此种划分 HepG2/DOX 对 DOX、MTX、CDDP、5-FU 为中等程度耐药,对 MMC 为低度耐药。HepG2/DOX 具有 MDR 的特征,可作为逆转肝肿瘤 MDR 研究的体外细胞模型。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在外界给予化疗药物的选择下,敏感的肿瘤细胞被杀死,而耐药细胞存活并增殖成为肿瘤细胞群中的干系细胞。这较好地解释了 MDR 细胞往往在染色体数目结构上与亲本有所差异及体外诱导 MDR 细胞的产生往往需要较长的时间。HepG2/DOX 与 HepG2 相比,干系细胞染色体减少,其结构发生了一些变化,70% 的 HepG2/DOX 细胞均有一条大 B 组染色体。尚不清楚此畸变的大 B 染色体上是否与耐药有关,需进一步研究。

Yang 报道耐药细胞在无药培养基内耐药水平逐渐下降[16],HepG2/DOX 在无 DOX 的培养基内生长五周后,其对 DOX 耐药倍数下降,但仍然保持对 DOX 的中等水平耐药。

本研究发现,HepG2 细胞和 HepG2/DOX 均有 PgP 的表达,HepG2/DOX 的表达较 HepG2 增强,同时也说明 HepG2 本身存在内源性 MDR。HepG2/DOX 对 MTX 也表现出耐药性,这与以往的报道不同[12]。MTX 主要作用于 S 期细胞,HepG2/DOX 生长速度减慢,倍增时间延长,S 期细胞比率相对较少,可能导致 HepG2/DOX 对 MTX 耐药,这也提示 HepG2/DOX 的耐药机制是多种机制并存的。

(感谢重庆医科大学计划生育系王应雄教授所做染色体分析。感谢粟毅硕士赠与 A549 细胞。)

参 考 文 献

[1] Flens MJ, Zamsn. GJR, Van dervalk, P, et al. Tissue distribution of multidrug resistance protein [J]. AM J Pathol, 1996;148:1237 - 1247.

[2] 马仲才,胥 彬. 肿瘤多药耐药性及其临床逆转[J]. 实用肿瘤杂志,1995;10(4):204 - 206.

[3] 关中宏,鲁功成,赵 军,等. 人膀胱癌多药耐受性细胞亚系 BIU - 87PR 的建立及生物学特征[J]. 临床泌尿外科杂志,1992;7(2):67 - 69.

[4] 胡义德,钱桂生. 人肺腺癌 A549 细胞系多重抗药性的形成[J]. 第三军医大学学报,1994;16(2):103 - 106.

[5]鄂 征,主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京出版社,1997;(2):164 - 172.

[6] Barbara. BK, Chin CH, David PA. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma protein and surface antigen[J]. Science, 1980;209(205):497 - 499.

[7] 李 羲,郭末健,钱桂生,等. 人肺腺癌细胞株中 PgP 表达与抗药程度关系[J]. 第三军医大学学报,1996;18:534 - 535.

[8] 陆家齐,陆连荣,蒋彦和,等. PdGC - 81 人体胃低分化腺癌细胞系的建立及其生物学特征的观察[J]. 中华肿瘤杂志,1986;1:4 - 6.

[9] 鄂 征,主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京出版社,1995;436 - 437.

[10] 杨唐俊,范立新,杨清浩. 人膀胱癌 BIU - 87 细胞多重抗药性的形成[J]. 中华泌尿外科杂志,1996;17(9):527 - 530.

[11] Fine RL, Pate J, Chabner BA. Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells [J]. Proc. Natl. Acad Sci USA, 1988;85(2):582 - 586.

[12] 郭 军,王宝成,师秋丽. 肝肿瘤多药耐药细胞株 P - gp, MRP, GST - 表达水平的观察[J]. 肿瘤研究与临床 1997;9(4):222 - 225.

[13] 关中宏,鲁功成,赵 军,等. 不同诱导方法建立的人膀胱癌多药耐受性细胞亚系 BIU - 87R 和 BIU - 87PR 的建立及生物学特征比较[J]. 中华泌尿外科杂志,1993;14(4):248 - 251.

[14] 胡 汛,潘锵荣,郑 树. P - 糖蛋白过表达不能完全解释 MDR 细胞株 K562/DOX 的抗药性[J]. 中华肿瘤杂志,1995;17:85 - 88.

[15] K. Snow, W. Judd. Charactedsation of adriamycin - and amasacdne - resistant human leukaemic T cell lines[J]. Br. J. Cancer, 1991;63:17 - 28.

[16] Yang. ly, Trujillo. JM. Biological characterization of multidrug resistant human colon carcinoma sublineS induced/selected by two methods[J]. Cancer Res, 1990;50:3218 - 3225.

[17] 张淑靖,冯 敏,殷建林,等. 多药耐药细胞系 K562/VCR 的建立及生物学特性的研究[J]. 中华血液学杂志,1992:13:622 - 624.

[18] 曹世龙,主编. 肿瘤学新技术与新理论[M]. 上海:上海科技出版社,1997;437 - 457.