维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2004)04 - 0405 - 04

HepG2/Adm 裸鼠移植瘤的建立及多药耐药特性评价

杨志宏，翟宝进，邵泽勇，伍 烽，王智彪

(重庆医科大学医学超声工程研究所，重庆 400016)

【摘 要】目的：建立一种人肿瘤多药耐药(MDR)细胞株裸鼠移植瘤模型并探讨其多药耐药机制，为体内研究逆转肿瘤多药耐药提供模型。方法：SPF 级动物常规饲养，裸鼠腋窝皮下接种 1×10^9 个细胞，观察其成瘤率及生长特性；MTT 法检测药物敏感性；流式细胞术、PR - PCR 法检测裸鼠移植瘤细胞与原代细胞的耐药特征。结果：HepG2/Adm 裸鼠移植瘤的成瘤率 100%；HepG2/Adm 细胞及 HepG2/Adm 裸鼠移植瘤对阿霉素(ADM)的 IC_{50} 分别为 4.21μg/ml 和 4.10μg/ml，两者比较未见显著性差异($P>0.05$)。原代及裸鼠体内 HepG2/Adm 的 P - gp、MRP 及 LRP 的表达率分别为 92% 和 91.8%，88.7% 和 88.1%、81.1% 和 80.7%，差异无显著意义；二者 MDR 相关基因 mRNA 表达量无差异($P>0.01$)。结论：以细胞建立的裸鼠移植瘤模型具有多药耐药特性，为研究人肿瘤 MDR 提供了理想的动物模型。

【关键词】肿瘤；多药耐药；裸鼠；移植；模型

【中国图书分类法分类号】R73 - 354 【文献标识码】A 【收稿日期】2003 - 10 - 27

Establishment and MDR characteristics of HepG2/Adm nude mice xenograft

YANG Zhihong, et al

(*Institute of Ultrasound and Engineering in Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish an animal model of HepG2/Adm nude mice xenograft and investigate the mechanism of multidrug resistance(MDR). *Methods*: HepG2/Adm cells were transplanted into the subcutaneous tissue in athymic nude mice. The differences in the MDR characteristics between HepG2/Adm and nude mice xenografts(HepG2/Adm/nude) were investigated. Cytotoxicity was determined with MTT assay. The expression of MDR - related gene protein and mRNA was examined by flow cytometry(FCM) and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT - PCR) respectively. *Results*: Tumor incidence was 100% after subcutaneous implantation with 10^9 of cells. IC_{50} values (the concentration producing 50% maximal inhibition) of Adriamycin(ADM) to HepG2/Adm and HepG2/Adm/nude were 4.21 μg/ml, 4.10μg/ml, respectively($P>0.05$). The expressions of MDR protein (P - gp, MRP and LRP) in HepG2/Adm and HepG2/Adm/nude were 92% and 91.8%, 88.7% and 88.1%, 81.1% and 80.7%, respectively($P>0.05$). The expression of MDR - related gene mRNA in HepG2/Adm/nude had no significant differences from that of HepG2/Adm (MDR) ($P>0.05$). *Conclusion*: HepG2/Adm/nude xenograft established by HepG2/Adm cells transplantation retains the characteristics of MDR phenotype. It can provide an ideal animal model for the study of human tumor MDR.

【Key words】Tumour; Multidrug resistance(MDR); Nude mice; Implantation; Model

多药耐药是肿瘤化疗失败的主要原因，也是肿瘤治疗急需解决的难题[1]。其基础和实验研究的深度和广度仍有限，主要是因缺少可供直接研究的肿瘤组织标本和供实验研究用的动物模型，裸鼠肿瘤模型是人们研究人类肿瘤生物特性以及肿瘤治疗常用的实验模型，它可以保持原发肿瘤本身所具有的形态特征和遗传性。目前，裸鼠肿瘤模型已成为研究逆转肿瘤多药耐药最重要的动物模型。本文为体内逆转肿瘤多药耐药研究制作了人肝癌裸鼠多药耐药模型，并对其生物学特征进行了研究，现报道如下。

作者介绍：杨志宏(1965 -)，男，副主任医师，博士生，主要研究方向：肿瘤超声治疗。

基金项目：国家自然科学基金委资助(No.30200060)，本实验室为省部共建国家重点实验室。

1 材料与方法

1.1 试剂

盐酸阿霉素(ADM，深圳万乐药业)；四唑蓝(MTT)，罗丹明 123(R123)来自 Sigma 公司；一抗 MRK16、MRPrl、

维普资讯 http://www.cqvip.com

LRP56 及作对照的鼠抗人 isotype－matched 单克隆抗体均购于法国国际免疫技术有限公司；二抗羊抗鼠 FITC 荧光标记抗体购于华美公司。

1.2 裸小鼠与细胞株

BALB/C－nu/nu 裸小鼠在无特定病原体(SPF)条件下饲养。人肝癌细胞株 HepG2 和 HepG2/Adm 由重庆医科大学超声医学工程研究所建立(对 ADM 耐药倍数为 26)。

1.3 皮下移植方法与多药耐药模型的建立

4 周～6 周龄裸小鼠共 40 只，雌雄兼用。对数生长期细胞(HepG2 及 HepG2/Adm)，调整细胞浓度为 1×10^9/ml 悬浮于 PBS 中。用 6 号针头的注射器抽取细胞悬液 200μl，分别接种于裸鼠的右腋下(各 20 只)，两组动物饲养于 SPF 条件下。每天观察记录 1 次。

1.4 观察项目

1.4.1 移植瘤的生长特点 每周解剖 2 只，观察移植瘤的生长情况，包括测体重和瘤重，计算肿瘤体积(V＝3/4AB2，A 瘤长径，B 瘤宽)，绘制生长曲线。

1.4.2 解剖学和组织学检查 所有处死或自然死亡的裸鼠均经详细的解剖学检查，了解局部浸润和远处脏器的转移情况。裸鼠移植瘤经 10% 中性福尔马林固定，石蜡切片，H.E 染色，光镜观察。

1.4.3 电镜观察 移植瘤组织以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定，Epon812 包埋，超薄切片，铀—铅双重染色，Philips－CM10 透射电镜观察。

1.5 多药耐药性的鉴定

1.5.1 细胞生长抑制实验 分别取移植瘤组织 0.5g，用 D－Hanks 液漂洗，置培养皿中剪碎并消化，予 200 目网筛过滤除去组织快，离心后用 RPMI1640 培养液漂洗 2 次，接种并传代 3 代后准备下一步实验。噻唑兰(MTT)法计算抑制细胞生长达 50% 时的阿霉素(ADM)浓度，以 IC50 值表示。

1.5.2 FCM 测定 P－gp、MRP 及 LRP 的表达量 将上述瘤组织制成单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^6/ml。取 250μlPBS 漂洗 1 次，分别加入 MRK16(对 MDR1、MRPrl(对 MRP)、LRP56(对 LRP)鼠抗人单克隆抗体，以鼠抗人 isotype－matched 单克隆抗体作对照。4℃ 孵育 1h，分别加入羊抗鼠荧光标记抗体，4℃ 孵育 30min，上 FCM 检测荧光强度，用荧光指数(FI)表示各耐药蛋白的相对表达量，以 HepG2 细胞各蛋白表达的平均荧光强度($FI=\bar{x}\pm2s$)为阴性表达标准，超过此值为阳性表达

1.5.3 RT－PCR 检测 MDR 基因表达 取上述瘤组织，总 RNA 提取按 Trizol(GIBCO)说明书进行。内参照采用 β－actin 基因，自行设计 PCR 引物。逆转录引物为 OligodT18，逆转录酶采用 MMLV(promega)，常规 50μlPCR 反应体系进行扩增。扩增条件：94℃ 变性 30s，不同温度退火 45s，72℃ 延伸 1min. PCR 反应后取部分产物，在 1.5% 琼脂糖凝胶上 80～100V 电泳，紫外灯下拍照。以 tMDR 与 β－actin mRNA 表达量的比值计算相对表达量。3 种 MDR 基因及 β－actin 引物序列如下：MDR1 基因：P15' － CGCCATTGCACGTGCCTGG－ 3' P25' － CCTTTCTCTTTCATGAGTTC － 3' (181bp)；MRP：P15' － ATCAAGACCGCTGTCATTGG－3' P25' － GAGCAAGGATGACTTGCAGG－3'(P2 bp)；LRP：P15' － ATCAAGACCGCTGTCATTGG－3' P2 5' － TGGAGCCATCGGTGATGAGG－3'(377bp)；β－actin：P1 5' GGCATCGTGATGGACTCCG－3'P25' － GCTGGAAGGTGGACAGCGA－3'(308 bp)；上海 Sangon 公司合成，PAGE 纯化。

1.6 统计学处理

采用 t 检验，$P<0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 MDR 细胞株 HepG2/Adm 裸鼠移植瘤模型的建立

HepG2/Adm 裸鼠皮下移植瘤成功率 100%(20/20)，平均潜伏期为 21 天，每天生长速度为 $1.6\pm0.48mm^3$，荷瘤鼠的平均生存期为 49±16 天，无远处转移发生。在此期间，每周解剖 2 只动物，结果显示，移植瘤生长速度随时间的延长呈直线递增($r=0.91$，$P<0.01$)，其倍增时间随肿瘤生长逐渐延长。荷瘤鼠体重自第 4 周开始下降。移植瘤生长曲线见图 1。

2.2 解剖学、组织学及超微结构观察

2.2.1 移植瘤的肉眼所见 潜伏期过后，病理学检查瘤体呈椭圆形或分叶状，表面光滑或呈结节状，肿瘤周围纤维组织包裹明显。覆盖其上的皮肤变红，肿瘤边缘部皮肤多有一过性出血呈紫黑色，瘤体直径＞2cm 时往往有溃破或干涸。移植瘤剖面呈粉红色，中央偶有出血坏死或液化。

2.2.2 光、电镜检查 H.E 染色与人肝癌相似，成多角形，核大深染，核仁明显，核分裂相多见，见图 2。电镜观察：细胞胞浆内粗面、滑面内质网及核糖体丰富，可见脂滴和毛细胆管、胆色素小体等类似人肝癌细胞特征。

2.3 MDR 特征的研究

2.3.1 裸鼠移植瘤对 ADM 的耐药特性

取裸鼠移植瘤搓网法分离细胞与原代细胞对 ADM 耐药特性的比较表明，ADM 对原代 HepG2/Adm、裸鼠 HepG2/Adm/nude、原代 HepG2、裸鼠 HepG2 的 IC50 分别为 4.21、4.18、0.16、0.16gg/ml。表明 HepG2/Adm 耐药倍数不变，见表 1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 HepG2/Adm 和 HepG2/Adm/nude 细胞对阿霉素(ADM)耐药特性的比较($\bar{x} \pm s$)

细胞	样本数(只)	IC50(μg/ml)	耐药倍数
Wild HepG2		0.16	
Wild HepG2/Adm		4.21**	26.31
HepG2/nude	20	0.16	
HepG2/Adm/nude	20	4.18***	26.13*

注:*HepG2/Adm/nude 与 HepG2/Adm 比较,$P>0.05$

**HepG2/Adm 与 Wild HepG2 比较,$P<0.01$。

***HepG2/Adm/nude)与 HepG2/nude 比较,$P<0.01$。

2.3.2 裸鼠移植瘤细胞 HepG2/Adm 的 P-gp、Mrp 及 Lrp 表达

比较取自裸鼠肿瘤搓网法分离细胞与原代细胞各耐药蛋白表达量及其 P-gp、MRP、LRP 阳性细胞百分率。结果表明,HepG2/Adm/nude 各耐药蛋白表达量与原代比较无明显差异。HepG2/Adm/nude 与原代 HepG2/Adm 的 P-gp、MRP、LRP 阳性细胞分别为 92% 和 91.8%、88.7% 和 88.1%、81.1% 和 80.7%。裸鼠 HepG2 和原代 HepG2 细胞的 P-gp、MRP、LRP 均为阴性(见图 3 A,B,C)。

2.3.3 MDR 基因 mRNA 的半定量 RT-PCR 分析 HepG2/Adm 细胞裸鼠移植瘤(HepG2/Adm/nude)中,mdrl、mrp、lrp 相对表达量分别为(0.71±0.21)、(0.74±0.29)、(0.80±0.23),原代 HepG2/Adm 细胞的表达量分别为(0.73±0.18)、(0.76±0.31)、(0.81±0.28),两者相比表达无差异($P>0.05$);与 HepG2 细胞裸鼠移植瘤(HepG2/nude)相比,mdrl、mrp 差异显著($P<0.01$),lrp 表达量接近显著($P=0.056$)。PCR 电泳结果见图 4。

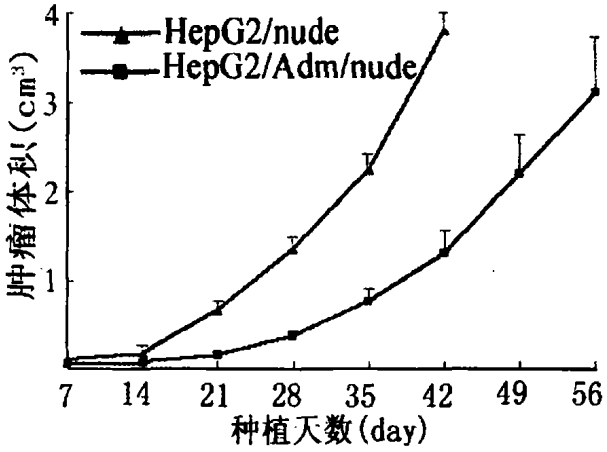


图 1 HepG2 和 HepG2/Adm 细胞裸鼠移植瘤生长曲线



图 2 HepG2/Adm 裸鼠移植瘤组织切片 HE×400

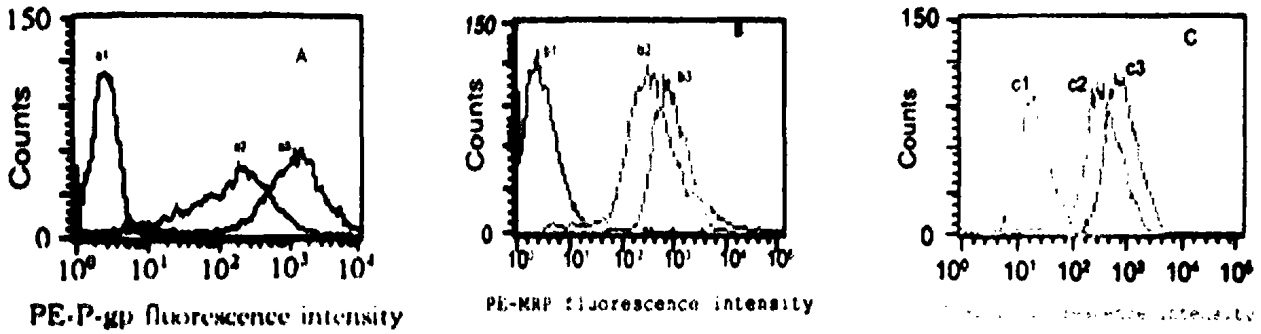


图 3 多药耐药蛋白流式细胞分析

A. P-gp 流式细胞分析结果:a1(HepG2/nude),a2(HepG2/Adm/nude),a3HepG2/Adm);

B. MRP 流式细胞分析结果-b1(HepG2/nude),b2(HepG2/Adm/nude),b3(HepG2/Adm);

C. LRP 流式细胞分析结果:c1(HepG2/nude),c2(HepG2/Adm/nude),c3HepG2/Adm).

3 讨 论

肿瘤多药耐药现象是肿瘤化疗成功的主要阻碍。因此,建立可靠的肿瘤多药耐药动物模型对研究逆转 MDR 具有重要意义。有关人肝癌的裸鼠皮

维普资讯 http://www.cqvip.com

下移植瘤模型和细胞系的建立国内外均有报道[2,3],但尚无有关建立人肝癌细胞系 HepG2 多药耐药裸鼠移植瘤模型的报道。在体外诱导建立人肝癌细胞系 HepG2 多药耐药模型— HepG2/Adm 基础上,成功地建立了人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型— HepG2/Adm/nude。本研究表明此裸鼠移植瘤模型较完整地再现了人肝癌的组织结构和功能特征,是较理想的人类肿瘤生物学模型,为研究逆转肿瘤多药耐药提供了同人体来源、易重复的良好实验动物体系。

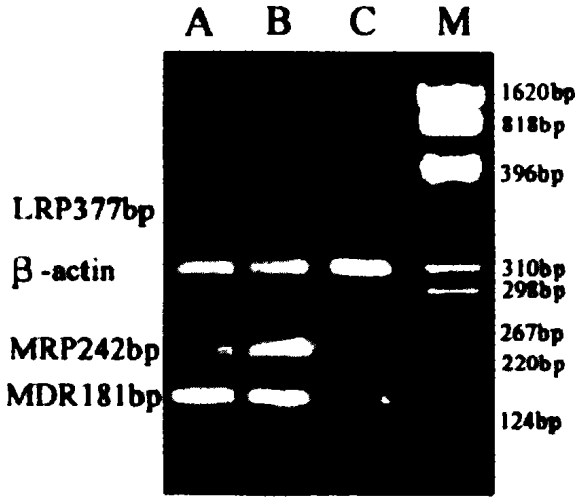


图 4 RT-PCR 所示在 mRNA 水平多药耐药基因改变
M: Marker, A: HepG2/Adm/nude, B: HepG2/Adm, C: HepG2 (对照)

近年来,国内外相继建立了白血病、肺癌、胃癌、肝癌等多药耐药细胞株[4]。体外研究表明,肿瘤细胞长期在低浓度的化疗药物作用下,可以产生多药耐药,其特征为耐药基因及其编码的蛋白过表达,细胞对化疗药物的外排增加,出现交叉耐药现象[5]。由于体外和体内研究尚存一定的差异,直接在动物体内建立多药耐药模型尤为重要。本研究中发现,裸鼠皮下移植瘤发展至晚期可以向周围组织浸润,甚至发生恶病质,但很少发生远处脏器转移。本方法操作简单,耐药特性与原代多药耐药细胞比较无明显差异,肿瘤表浅便于观察与治疗,是模拟人体内逆转肿瘤多药耐药研究的一种重要手段。

研究结果显示,以具有 MDR 特征的 HepG2/Adm 细胞建立的裸鼠移植瘤模型,不仅成瘤率高(达 100%),而且在裸鼠体内生长良好,肿瘤长至 1.0g (2 个月以上)以上时,其对 ADM 的耐药倍数不改变,与原代耐药细胞相比,耐药机制主要与 P-gP、MRP 及 LRP 的过表达有关。表明该模型可靠,可提供体内逆转 MDR 的研究。

参 考 文 献

[1] Schwarzenbach H. Expression of MDR1/P-glycoprotein, the multidrug resistance protein MRP, and the lung-resistance protein LRP in multiple myeloma[J]. Med Oncol, 2002; 19(2):87-104.

[2] Sun FX, Tang ZY, Liu KD, et al. Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via orthotopic implantation of histologically intact tissues [J]. Int J Cancer, 1996;66(2):239-243.

[3] 帅长宏,范建义,李六金,等. 人肝癌裸鼠转移模型的建立[J]. 第四军医大学学报,2001;22(22):2072.

[4] Iwasaki I, Sugiyama H, Kanazawa S, et al. Establishment of cisplatin-resistant variants of human neuroblastoma cell lines, TGW and GOTO, and their drag cross-resistance profiles [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2002;49(6):438-444.

[5] Georges E, Sharom F J, Ling V. Multidrug resistance and chemosensitization: therapeutic implications for cancer chemotherapy[J]. Adv Pharmacol, 1990;21:185-220.