

耐长春新碱人卵巢癌细胞系的建立 和耐药机制的研究*

Establishment of a New Vincristine-resistant Human Oophoroma Cell Line and its Mechanism of Drug Resistance

李力 陈心秋 黄薇 唐东平 黎丹戎
Li Li Chen Xinqiu Huang Wei Tang Dongping Li Danrong

(广西医科大附属肿瘤医院 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical Univ., 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 采用浓度递增和短期作用法, 从人卵巢上皮癌细胞 A2780中筛选培养出对长春新碱 (VCR) 耐药的细胞亚株 (A2780/VCR), 并对其耐药指数、交叉耐药性、细胞内 VCR含量以及细胞多药耐药基因、谷胱甘肽 S转移酶表达进行检测, 结果: A2780/VCR对 VCR的耐药指数高达 61000倍, 并呈多药耐药性; A2780经 VCR诱导耐药后, 细胞内 VCR含量为 0; 耐药细胞内 MDR₁表达呈阳性, 而 GST π 表达则为阴性。上述结果表明 A2780/VCR为一获得性高耐受性细胞系, 并呈多药耐药特征, 其耐药机理与多药耐药基因表达有关。

关键词 卵巢肿瘤 长春新碱 药物耐受性 细胞系

Abstract A novel VCR-resistant cell line was developed by gradually increasing dose and shortly acting with VCR and its tolerance, cross tolerance, VCR content of cell and the multidrug resistance gene (MDR₁) of cell and glutathion transferase π (GST π) was measured. A2780/VCR cell was 61000-fold to VCR and released characterization of multidrug resistance. Compared with A2780, the content of VCR in A2780/VCR is zero. In A2780/VCR, positive MDR₁ and negative GST π . These results showed that A2780/VCR cell line was acquired resistance drug with a characterization of multidrug resistance, and the A2780/VCR resistance to VCR was correlated with overexpression of MDR₁.

Key words oophoroma, vincristine, multidrug resistance, cell line

中图分类号 R 737.31

长春新碱 (VCR) 是目前临床使用较广泛的抗癌药之一, 但由于该药较易为肿瘤组织特别是卵巢癌产生抗药性, 因此在临床使用受到一定的限制。为了解卵巢癌对 VCR耐药的特征以及其耐药机理, 我们采用递增 VCR浓度短期作用法, 体外连续培养建成一株人卵巢癌 A2780/VCR耐药细胞系, 现将结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 研究材料

人卵巢癌细胞系 A2780由中国医学科学院肿瘤所惠赠, 该细胞系引自美国。

1.2 药品

阿霉素 (意大利爱宝大药厂); 长春新碱 (VCR, 广州明兴制药厂); 顺铂和卡铂 (DDP和 CARP, 云南个旧生物制药厂); 更生霉素 (KSM, 上海新亚药业公司); 足叶乙甙 (VP16, 江苏省连云港制药厂); 甲胺喋呤和环磷酰胺 (MTX和 CTX, 上海第十二制药厂); 平阳霉素 (PYM, 天津市河北制药总厂); 5-氟尿嘧啶 (5-Fu, 上海海普制药厂)。

1.3 试剂

噻唑兰 (MTT), 异硫氰酸胍, 二乙基焦碳酸 (DEPL) 均为美国 Sigma公司产品; GST π 单克隆抗体由中国医学科学院提供; 免疫组化试剂盒购自福州迈新公司; 逆转录 cDNA合成试剂盒购自美国 Promega公司; 多药耐药基因 (mdr-1) 和 β 2微球蛋白 (β 2-MG) 寡核苷酸引物由赛百盛生物工程公司合

1997-09-08收稿

* 广西区科委攻关项目资助

成。

1.4 细胞培养与 A2780/VCR耐药株的诱导

人卵巢癌 A2780细胞株在 RPMI-1640培养液内含 10% 小牛血清条件下贴壁生长。采用浓度递增和短时间作用法诱导^[1],取对数生长期 A2780细胞与 VCR作用 1h,药物从低浓度开始逐渐加大剂量诱导,VCR最大诱导剂量为 160 mg/mL,在每加大剂量过程中,敏感细胞逐渐死亡,耐药细胞经不含药物培养基中继续培养至对数期,如此反复诱导,换液,传代,历时 9月余。

1.5 细胞生长曲线测定

24孔板中每孔含 1×10^4 /mL单细胞悬液,在 37°C,5% CO₂的培养箱中培养。第 2~6天各计数两孔细胞数,取均值,绘制时间-细胞数曲线。并按 Patterson公式^[1] $Td = T \lg 2 / \lg (N / N_0)$ 计算细胞在对数生长期的倍增时间。

1.6 药物敏感试验和交叉耐药检测

采用 MTT法,方法参照文献[2] 其杀伤率=对照孔 OD-药物组 OD/对照孔 OD $\times 100\%$ 。绘制剂量效应曲线,确定半数致死量(LD50),耐药指数(RI) = 耐药细胞 LD50/A2780 LD50

1.7 细胞内 VCR聚积量的测定

采用高效液相色谱法,在每孔中加预先培养 24 h生长良好的细胞悬液 1×10^4 和 25 mg/mL的 VCR,培养 24 h后,用生理盐水洗 3次,去掉上清液,加蒸馏水 0.5 mL,反复冻融使细胞破裂,混匀,用高速离心机离心 30 min,上清液在 LC-4A高效液相色谱仪上测 VCR的荧光强度。色谱条件为: Zorbax-ODS反相柱 25 cm \times 4.6 cm,流动相: 0.02 mol/L K₂HPO₄ (pH值= 6.6); CH₃OH(20/80 V/V),流速 1.0 mL/min;柱温 50°C;检测波长: 267 nm;量程: 0.005; C-R2AX数据处理机。计算按两点校正曲线法,以峰高定量。

1.8 细胞谷胱甘肽 S转移酶 (Glutathion S-transferase π , GST π)表达测定

采用免疫组织化学法(SP法),细胞爬片 36 h后取出,再用 PBS冲洗,2.5%戊二醛固定 30 min,用 PBS冲洗后,进行免疫组化染色,按试剂盒说明书操作,染色后 DAB显色,苏木素衬染,脱水,透明,封片,光镜观察,结果判断以已知 GST π 阳性的耐药细胞系 A2780/DDP爬片免疫组化染色结果为阳性对照,以 PBS代替一抗的免疫组化染色结果为阴性对照,结果分析参照 Wright等^[3]提出的标准

1.9 细胞多药耐药基因 (Multidrug resistance gene MDR₁)表达测定

采用 RNA多聚酶链反应(RT-PCR)方法测定,PCR引物及实验过程参照文献[4]报道的方法,实验时选择耐药细胞系 KBV cDNA为阳性对照,药物敏感细胞系 A2780 cDNA为阴性对照,离子水为空白对照,PCR终产物经 2%琼脂糖分离后,在紫外灯下观察其特异片段并置于岛津 CS-936薄层扫描仪上扫描计算相应的峰面积,若 MDR₁峰值 β -2-MG峰值大于 1.0时为 MDR₁ 基因表达阳性。

2 结果

2.1 A2780/VCR细胞系的耐药水平及耐药特征

从表 1可见,A2780/VCR对 VCR耐药指数可达 61000,A2780/VCR除对 VCR耐药外,也表现出多药耐药现象,其中对 MTX、CTX、5-Fu呈高度耐药;对 Carp、Vp16、PYM、ADM呈中度耐药;对 KSM和 DDP无交叉耐药现象出现。

表 1 耐药细胞耐药特征

Table 1 Characterization of drug resistance for vincristine resistance cell line

化疗药物 Drug used	LD50 (mmol/L)		RI
	A2780	A2780/VCR	
长春新碱 (VCR)	0.0008	48.8	61 000
顺铂 (DDP)	14.16	0.39	0.028
阿霉素 (ADM)	1.81	221	122
更生霉素 (KSM)	0.09	1.9	21
足叶乙甙 (VP16)	54.97	127	2.32
卡铂 (CARP)	28.96	117	4.05
甲胺喋呤 (MTX)	0.52	1196	2301
环磷酰胺 (CTX)	418	2377	5.69
平阳霉素 (PYM)	2.66	52.6	19.77
氟尿嘧啶 (5-Fu)	359	21 525	60

LD50 半数致死剂量 Lethal dose of 50%; RI: 耐药指数 Index of drug resistance.

2.2 A2780/VCR的生长曲线

A2780和 A2780/VCR的倍增时间分别为 26 h和 44 h,A2780/VCR的倍增时间明显长于 A2780,两者相比较,差异有显著性 ($P < 0.05$)

2.3 细胞内 VCR聚积量

A2780和 A2780/VCR分别与 VCR接触培养后,结果:A2780细胞内 VCR量为 0.20 μ g/mL,耐药细胞中 VCR含量为 0 μ g/mL,两者相比较差异有显著性 ($P < 0.05$)

2.4 A2780和 A2780/VCR细胞的 GST π 和 MDR₁表达

A2780的 GST π 和 MDR₁ 表达均为阴性;A2780/VCR细胞内 GST π 表达为阴性而 MDR₁ 表达为阳性,MDR₁ β -2-MG比值为 2.10

3 讨论

长春新碱为一广谱生物碱类抗癌药,在临床已广泛使用,但据已有的研究资料结果^[5]显示,对卵巢上皮癌的疗效并不理想,本研究资料也显示,卵巢上皮癌细胞系 A2780对 VCR极易产生耐药,在以 VCR递增浓度短期作用,体外连续传代培养下, A2780可对诱导的 VCR产生高达 61 000倍的耐受,同时对 VCR高耐受情况下, A2780/VCR除细胞倍增延长外,其余生物特性均与母本细胞 A2780相似,这从一个侧面反应,临床上应用 VCR治疗卵巢上皮癌疗效差与其易对 VCR产生耐药有关。

肿瘤细胞对一种抗癌药物耐受时,对其他结构或药物耐受时亦可产生耐药性,称多药耐受 (multidrug resistance, MDR)^[6]。本研究也证明,所建立的 A2780/VCR细胞系除对 VCR产生耐药外,也对其他非诱导药物产生耐药,呈现多药耐药的特征,但耐受程度不匀性,除对结构相似的 VP16等产生耐药,也对化学结构完全不同的 5-Fu, Carb 等产生耐药,但对 DDP, KSM则不产生耐药。这一结果为临床选择有效抗癌药物,避免耐药提供了一个参考依据。

本研究结果也显示, A2780细胞系在未加 VCR诱导耐药之前, MDR₁表达呈阴性,但加 VCR诱导之后, A2780/VCR则 MDR₁表达呈阳性,这表明 A2780/VCR的耐药现象与其 MDR₁表达有关。已有研究表明: MDR₁的扩增或过度表达使其编码产物 P-糖蛋白 (P-glycoprotein)过度产生,是导致肿瘤耐药的主要原因之一^[7]。P-糖蛋白为细胞膜上依赖能量的通道蛋白,起着能量依赖的外输泵作用,能降低细胞内有效的药物浓度而导致耐药。本研究也对

A2780/VCR进行了谷胱甘肽 S转移酶表达的检测,结果显示, A2780在 VCR诱导耐药的前后均无 GST π 表达,这表明谷胱甘肽解毒系统未参与 A2780/VCR的耐药机制。

A2780/VCR的建立,并初步揭示其耐药特点为多药耐受性而对诱导药物呈高度耐受,其耐药机理与 MDR₁基因的过度扩增表达有关,这为进一步研究 VCR耐药及逆转药物都提供了一个较好的体外实验模型。

参考文献

- 1 Akoby WB. Methods in enzymology: cell culture. New York: Acad Press, 1979, lv: 150.
- 2 唐东平,陈心秋,王威廉等. MTT法药敏试验预测卵巢癌对化疗药物的敏感性. 广西医学, 1996, 18(6): 666.
- 3 Wright G, Cairns J, Cantwell B, Jet al. Response to mitoxantrone in advanced breast cancer correlation with expression of c-erbB2 protein and glutathion-transferases. Br J Cancer 1992, 65: 271.
- 4 Noonan KB, Beck C, Holzmayer TA et al. Quantitative analysis of MDR₁ (multidrug resistance gene) expression in human tumor by polymer a chain reaction. Pro Natl Sci USA 1990, 87: 1160.
- 5 Dalton WS, Durie BM, Alberts DS et al. Characterization of a new drug-resistant human myeloma cell line that expresses P-glycoprotein. Cancer Res, 1986, 46: 5125.
- 6 Johnson SW, Ozols RF. Mechanism of drug resistance in ovaruab cancer, 1993, 71: 644.
- 7 Holzmayer Hilsenbeck S, Von-Hoff DD et al. Clinical correlate of MDR₁ (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. J Natl Cancer Inst, 1992, 84: 1486.

(责任编辑: 蒋汉明)