

阿霉素耐药的乳腺癌 MCF-7/Adm 细胞系的建立及其耐药特性

郑婷婷, 潘姝花, 郑旭升, 吴登伟, 许传莲

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘要: 建立肿瘤耐药细胞系是研究肿瘤细胞的重要手段之一,也是探讨肿瘤多药耐药机制及其逆转的基础。采用大剂量间歇诱导法诱导 MCF-7 细胞,建立 MCF-7/Adm 耐药模型;MTT 法检测耐药倍数;流式细胞术检测 MCF-7 细胞和 MCF-7/Adm 细胞中阿霉素的积累量;real-time PCR 检测 MCF-7/Adm 细胞中 ABCG2、ABCC1、ABCB1 基因的表达。结果显示,阿霉素抑制 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞存活的 IC_{50} 值分别为 $0.535 \mu\text{g/mL}$ 和 $173.275 \mu\text{g/mL}$,耐药倍数为 324;MCF-7 细胞中的阿霉素积累量较 MCF-7/Adm 明显高;MCF-7/Adm 细胞中 mRNA 水平 ABCB1 基因表达明显上调,ABCG2 和 ABCC1 基因表达下调。成功获得对阿霉素耐药的人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/Adm,为进一步研究乳腺癌多药耐药机制及其逆转提供有利工具,并且对乳腺癌化疗药物的筛选具有一定的意义。

关键词: 阿霉素;乳腺癌;耐药;ABCB1

中图分类号: R737.9 **文献标志码:** A

0 引言

乳腺癌是女性多发的恶性肿瘤之一,对妇女的身心健康造成严重威胁。据统计,世界范围内每年新增患者约 200 万人,死亡率呈逐年上升趋势^[1-2]。目前,乳腺癌的治疗中,化疗占有十分重要的地位,尤其是对于癌细胞已经扩散的患者,化疗是主要的治疗方法。然而随着化疗药物使用时间的增长,化疗药物对肿瘤细胞的杀死作用逐渐减小,同时也会表现出对不同结构和作用机理的药物产生交叉耐受性,这种现象称为多药耐药性(multidrug resistance,MDR)^[3]。肿瘤细胞对化疗药物产生交叉耐药是化疗成功的主要障碍,对肿瘤的治疗极为不利,也是困扰着肿瘤学家和癌症患者的一个重大问题。MDR 发生机制比较复杂,但目前 ABC 转运蛋白(the ATP-Binding Cassette Transporters)被认为是导致 MDR 的主要机制之一,其在肿瘤多药耐药产生中的主要作用是将化疗药物由肿瘤细胞内泵至细胞外,降低细胞内药物浓度,从而导致 MDR 的产

生^[4],其中与临床肿瘤治疗关系最密切的是 ABCB1、ABCC1、ABCG2。建立耐药细胞系是研究肿瘤细胞的重要手段,对肿瘤的治疗具有十分重要的意义,是探讨恶性肿瘤多药耐药机制及其逆转多药耐药性的基础。本研究采用大剂量间歇诱导法诱导 MCF-7 细胞,建立阿霉素耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞系,并检测耐药模型较亲本株的耐药倍数,细胞内药物的积累量等参数,以及多药耐药的标志基因 ABCB1、ABCC1、ABCG2 的表达变化,为深入研究肿瘤耐药及多药耐药逆转提供理想的模型和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药物与主要试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞系购于中国科学院上海细胞生物所,1640 培养液购于康宁公司,胎牛血清购于 Thermo 公司,0.25%胰酶购于碧云天公司,噻唑蓝(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT)、二甲基亚砜(Dimeth-

yl sulfoxide, DMSO) 购于 sigma 公司, 阿霉素 (Adriamycin, ADR) 购于生工生物公司。

1.2 MCF-7 细胞株的培养

用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 1 640 培养液在 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 3~5 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 耐药人乳腺癌细胞模型 MCF-7/Adm 的建立

采用大剂量间歇诱导 MCF-7 细胞^[5]。①取对数期生长的 MCF-7 细胞按 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 每孔加 190 μ L 细胞悬液, 培养 24 h 后, 加入终浓度为 0.02、0.1、0.5、2.5、12.5 μ g/mL 的阿霉素 10 μ L/孔, 设 3 个复孔; 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h; 加入 5 mg/mL 的 MTT 10 μ L 继续培养 4 h, 弃去培养上清, 每孔加入 DMSO 150 μ L 摇床上摇 10 min, 测定各孔的 OD₅₇₀ 值, 计算阿霉素对 MCF-7/细胞增殖的抑制率及 IC₅₀。其计算公式为:

细胞生长抑制率/% = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{调零组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{调零组 OD 值})] \times 100$ 。

②取 MCF-7 细胞接种于 6 cm 培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 进入对数生长期后加入终浓度为 0.6 μ g/mL ($> IC_{50}$) 的阿霉素, 作用 12 h, 弃含药培养液换不含阿霉素的培养液培养数代, 待细胞生长状态良好以后, 按上述方法重复, 直至细胞能维持在 0.6 μ g/mL 阿霉素浓度下长期培养即成为耐药人乳腺癌细胞模型 MCF-7/Adm。

1.4 MTT 法检测 MCF-7/Adm 细胞系的耐药指数

取对数期生长的 MCF-7 细胞, 调整细胞密度, 按每孔 8×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔加 190 μ L 细胞悬液, 培养 24 h 后, 加入不同浓度的 ADR, 其终浓度分别为 0、1、5、25、125、250 μ g/mL, 每孔总体积 200 μ L; 设对照孔为不加药物的; 调零孔为不加细胞的培养液, 每组设 3 个复孔。置于饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h, 各孔加入 MTT (5 mg/mL) 10 μ L, 继续培养 4 h, 弃去培养上清, 每孔加入 DMSO 150 μ L 摇床上摇 10 min, 测定各孔 OD₅₇₀ 值, 计算阿霉素对 MCF-7/Adm 细胞增殖的抑制率及 IC₅₀ 值、耐药指数。其计算公式为:

耐药指数 (RI) = 耐药细胞 IC₅₀ / 野生型细胞 IC₅₀。

1.5 流式细胞术测定细胞内药物的积累量

取生长状态良好的对数生长期 MCF-7 细胞、MCF-7/Adm 细胞, 分别以 1×10^5 个细胞接种于 6

cm 培养皿中, 加 RPMI 1 640 培养液培养 24 h 后, 在培养液中加入阿霉素至终浓度为 5 μ g/mL, 培养 24 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次, 在重悬于冷 PBS 中, 上流式细胞仪检测 (激发波长 488 nm, 反射波长 575 nm)。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 MCF-7/Adm 细胞中 ABCG2、ABCC1、ABCB1 基因的表达

取对数生长期的 MCF-7 细胞、MCF-7/Adm 细胞, 分别以 1×10^5 个细胞接种于 6 cm 培养皿中, 加 RPMI 1640 培养液培养 72 h 后, 收集细胞。Trizol 法提取总 RNA, 检测其浓度和纯度。经过逆转录分别得到其 cDNA, 用于 Real-time PCR 扩增。引物如表 1 所示, PCR 体系的总体积为 20 μ L, 其中包括 ddH₂O 6.4 μ L, 上下游引物分别 0.8 μ L, 已稀释的 cDNA 2 μ L, SYBR 10 μ L, 置于实时定量 PCR 仪设置反应程序并进行 PCR 反应。设置反应条件为: 预变性 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环后收集荧光。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析数据。

表 1 基因的引物序列及其扩增产物大小

基因	Real-time qPCR 引物序列	产物大小/bp
GAPDH	F: AGAAGGTCGGAGTCAACGGA	227
	R: CTACTGGAAGATGGTGTATGGGA	
ABCG2	F: TTCGCCGTCTCAACGCCATCC	190
	R: GCCGAGTGGCCATCACAACA	
ABCC1	F: AATGGCGGAGTTCCTGCTTAC	218
	R: TTGATGCGGTGCTGTTGTGG	
ABCB1	F: GGAATGCGACAGGAGATAGG	245
	R: AAGTGGTTTGCCAGACAGC	

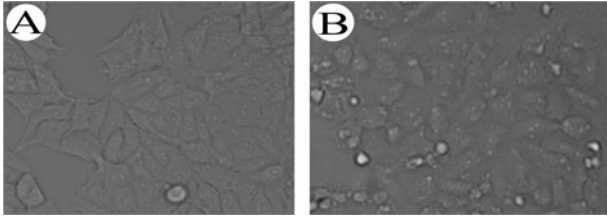
1.6 统计学处理

使用 SPSS 17.0 软件统计分析, 采用 *t* 检验、方差分析, 资料以均数 ± 标准差表示。

2 结 果

2.1 大剂量间歇诱导出 MCF-7/Adm 细胞

通过终浓度为 0.6 μ g/mL 的阿霉素反复间歇诱导, 历时 8 个月成功诱导出 MCF-7/Adm 细胞。冻存复苏后细胞仍能稳定生长、增殖。如图 1, 与野生型 MCF-7 细胞比较, 耐药细胞株 MCF-7/Adm 的形态发生明显变化, 边缘不再呈尖角梭型, 相对比较圆滑。野生型 MCF-7 细胞之间接触比较紧密, 而耐药细胞株 MCF-7/Adm 之间间隙比较大, 排列比较松散。在培养过程中发现, 耐药细胞株 MCF-7/Adm 消化时间较野生型稍长。



A. 诱导前的 MCF-7 细胞, B. 诱导成功的 MCF-7/Adm 细胞

图 1 MCF-7 细胞及 MCF-7/Adm 细胞的形态观察(×200)

2.2 ADM 对 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞毒性作用及耐药指数的检测

不同浓度的 ADM 作用于 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞 48 h 后,如图 2 所示,ADM 对 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞的抑制率都随着 ADM 浓度的升高而增大,但 ADM 对 MCF-7 细胞的抑制作用明显比 MCF-7/Adm 的强,0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ADM 已经对 MCF-7 细胞产生抑制作用,但 ADM 浓度增加为 50 倍即 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 MCF-7/Adm 未见明显抑制作用。与 MCF-7 细胞相比,MCF-7/Adm 细胞对 ADM 有明显的耐药性(表 2),MCF-7/Adm 细胞的耐药指数 RI 为 324 倍($P<0.01$)。

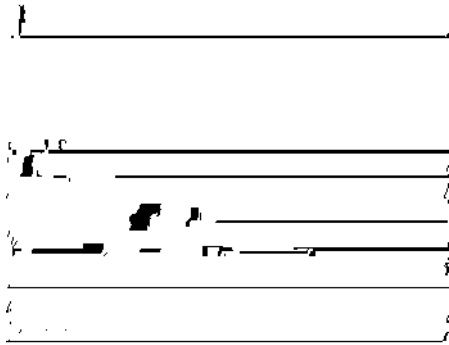


图 2 阿霉素对 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞增殖抑制作用(48 h)

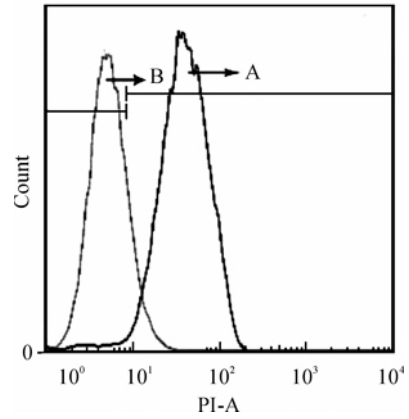
表 2 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞对阿霉素的敏感性

药物	IC_{50} 值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		耐药指数
	MCF-7 细胞	MCF-7/ADM 细胞	
阿霉素(ADM)	0.535 ± 0.01	173.275 ± 1.32	324

2.3 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞内阿霉素药物蓄积量的测定

用终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ADM 处理 MCF-7 细胞和 MCF-7/Adm 细胞 24 h 后,流式细胞术检测 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞内阿霉素荧光强度,结果如图 3 显示 MCF-7 细胞内 ADM 的荧光强度明显比 MCF-7/Adm 高,分别为 98.6%和 51.4%。说明 MCF-7/Adm 细胞内的阿霉素蓄积量明显低于 MCF-7 细胞,进一步说明 MCF-7/Adm 细胞较

MCF-7 细胞对阿霉素产生耐药性。



A. 诱导前的 MCF-7 细胞; B. 诱导成功的 MCF-7/Adm 细胞

图 3 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞内阿霉素荧光强度

2.4 Real-time PCR 检测 MCF-7/Adm 细胞中多药耐药的标志基因 ABCG2、ABCC1、ABCB1 的表达

Real-time PCR 结果显示,与敏感细胞株 MCF-7 相比,MCF-7/Adm 细胞内 ABCG2、ABCB1 和 ABCC1 基因的表达有明显差异,如图 4,ABCG2 和 ABCC1 在耐药细胞中表达水平下调,而 ABCB1 在耐药细胞中表达水平上调。

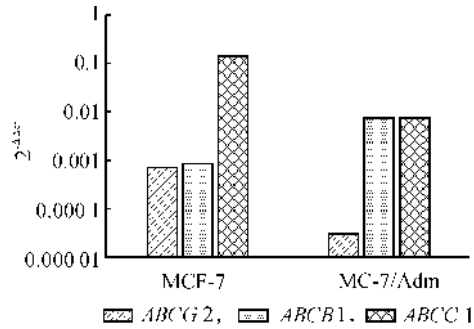


图 4 MCF-7 和 MCF-7/Adm 细胞内基因 ABCG2、ABCC1、ABCB1 的表达

3 讨论

目前肿瘤的多药耐药性仍被视为化疗中的最大障碍。各种肿瘤细胞获得耐药性的机制,都可能成为今后化疗的靶点^[6]。因此,深入研究肿瘤细胞耐药性机制的产生,寻找关键的靶点,进而针对靶点设计逆转肿瘤细胞多药耐药性的药物,为降低癌症死亡率和提高治愈率增加希望^[7]。

肿瘤耐药细胞株的建立是研究 MDR 发生机制和逆转策略的重要手段。可以说,目前已知的 MDR 机制几乎都首先在耐药细胞株中发现,而后在临床病人中得到证实的^[8]。国内外学者们用药物递增诱导法建立了多种耐药肿瘤细胞株,以深入研

究肿瘤耐药的机制。体外建立耐药细胞株作为研究肿瘤细胞 MDR 机制的重要工具至今已有 20 多年的历史,已产生多种诱导耐药,建立耐药细胞系的方法^[5,8-9]。阿霉素(adriamycin, ADM)是目前临床上应用较为广泛的抗肿瘤药物,抗癌谱较广,主要适用于急性白血病,对急性淋巴细胞白血病及粒细胞白血病、乳腺癌、肉瘤、肺癌、膀胱癌等都有一定疗效^[10]。它是一种蒽环类抗生素,主要是通过进入细胞核固定在拓扑异构酶 II α -DNA 复合体上,影响细胞增值,达到杀伤肿瘤细胞的目的,对各种生长周期的肿瘤细胞都有一定的杀伤作用^[11]。研究表明,肿瘤化疗过程中长期使用阿霉素会导致肿瘤细胞对其产生耐药性,而且已经有很多阿霉素耐药细胞株构建成功的例子,所以本课题用阿霉素诱导乳腺癌细胞 MCF-7,建立可靠的肿瘤细胞多药耐药性模型。

本研究所采用的大剂量间歇诱导法与临床周期性化疗相似,更好地模拟临床上化疗患者出现的耐药现象,它对肿瘤多药耐药性的研究更有意义。经过此方法成功诱导得到 MCF-7/Adm 耐药株,其耐药指数为 324。其细胞形态较野生型 MCF-7 细胞发生明显变化,而且在培养过程中也发现耐药株生长也相对缓慢,胰酶消化时间也较野生型稍长。MTT 结果提示两株细胞对 ADM 的敏感性存在着显著的差异($P < 0.01$)。0.02 $\mu\text{g/mL}$ 的 ADM 已经对 MCF-7 细胞产生抑制作用,但 ADM 浓度增加为 50 倍即 1 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 MCF-7/Adm 未见明显抑制作用,提示 MCF-7/Adm 细胞对 ADM 产生了显著的耐药性。流式细胞术检测结果显示耐药株内阿霉素浓度明显降低,这进一步说明耐药细胞株构建成功。Real-time PCR 结果显示耐药细胞内 ABCB1 基因表达上调,而 ABCC1 基因和 ABCG2 基因表达下调。初步推断其产生耐药性与 ABCB1 基因表达上调有关,ABCB1 导致肿瘤多药耐药主要是将化疗药物由肿瘤细胞内泵至细胞外,降低细胞内药物浓度,从而导致 MDR 的产生^[12]。至于另外两种耐药相关基因表达下调的原因尚不清楚,尚需进一步研究。考虑到肿瘤多药耐药的分子机制非常复杂,是基因突变、相关蛋白的表达、各种酶介导、干细胞靶点表达缺失等多因素,多步骤综合作用的结果^[13],需进一步深入研究。

总之,本研究成功建立了一种人乳腺癌耐阿霉素的细胞株 MCF-7/Adm,为进一步研究乳腺癌多药耐药性的机制及耐药性逆转的药物提供有利工

具,并且对抗乳腺癌化疗药物的筛选具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 黄哲宙,陈万青,吴春晓,等. 中国女性乳腺癌的发病和死亡现状:全国 32 个肿瘤登记点 2003—2007 年资料分析报告[J]. 肿瘤, 2012, 32(6): 435-439.
- [2] 王希龙,邱文秀,贾中明,等. 乳腺癌的诊断现状及最新进展[J]. 中国综合临床, 2012, 28(8): 787-788.
- [3] Liu F S. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy: a quick review[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2009, 48(3): 239-244.
- [4] Schinkel A H, Jonker J W. Mammalian drug efflux transporters of the atp binding cassette (abc) family: an overview[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64(22): 138-155.
- [5] Zhou Y, Ling X L, Li S W, et al. Establishment of a human hepatoma multidrug resistant cell line in vitro [J]. World Journal of Gastroenterology, 2010, 16(18): 2291-2297.
- [6] 韩宜男,钱江. 肿瘤干细胞及其耐药性机制研究[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2012, 12(2): 123-125.
- [7] Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer [J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(8): 1873-1899.
- [8] Watson M B, Lind M J, Cawkwell L. Establishment of in-vitro models of chemotherapy resistance[J]. Anticancer Drugs, 2007, 18(7): 749-754.
- [9] Li L, Luan Y, Wang G, et al. Development and characterization of five cell models for chemoresistance studies of human ovarian carcinoma[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2004, 14(2): 257-264.
- [10] Lin R, Shi N L, Wang C H. In vitro study of anti-cancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles [J]. Biomaterials, 2005, 26(21): 4476-4485.
- [11] Myers C E, McGuire W P, Liss R H, et al. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response[J]. Science, 1977, 197(4299): 165-167.
- [12] Kapoor K, Sim H M, Ambudkar S V. Multidrug Resistance in Cancer: A Tale of ABC Drug Transporters [M]. New York: Springer, 2013: 1-34.
- [13] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley D B, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm[J]. Nature Reviews Cancer, 2013, 13(10): 714-726.

Establishment of Adriamycin-Resistant Breast Cancer MCF-7/Adm Cell Line and the Drug Resistance Feature

ZHENG Ting-ting, PAN Shu-hua, ZHENG Xu-sheng, WU Deng-wei, XU Chuan-lian

(School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Establishment of tumor drug-resistant cell lines is an important method to study tumor cells and is also the foundation of exploring tumor multidrug-resistant mechanism and the reverse. This paper adopted high-dose intermittent deduction method to induce MCF-7 cells and establish MCF-7/Adm drug-resistance model. MTT method is used to detect the drug-resistance times. Flow cytometry is used to detect the accumulation of adriamycin in MCF-7 cell and MCF-7/Adm cell. Real-time PCR was adopted to detect the genetic expression of *ABCB1*, *ABCC1* and *ABCG2* in MCF-7/Adm cell. The results show IC_{50} values of MCF-7 and MCF-7/Adm cells restrained by adriamycin are 0.535 and 173.275 $\mu\text{g/mL}$ respectively, with drug-resistance times of 324; adriamycin accumulation in MCF-7 cells was significantly higher than that in MCF-7/Adm cells; genetic expression of *ABCB1* in MCF-7/Adm cells at mRNA level up-regulated obviously; genetic expression of *ABCC1* and *ABCG2* down-regulated. This paper successfully gains adriamycin-resistant breast cancer drug-resistance cell strain MCF-7/Adm which provides a helpful tool for studying breast cancer multidrug resistance mechanism and the reverse. It is also significant to choose effective anti-cancer drugs.

Key words: adriamycin; breast cancer; drug resistance; *ABCB1*

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 174 页)

Preparation of Nanogold and Investigation of Shape Control

YANG Rong, PAN Yue, WANG Tao, WANG Sheng

(Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology, Ministry of Education, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Monodisperse Au nanoparticles are prepared by applying the principle of silver mirror reaction and using glucose as the reducing agent under the condition with the surfactant. The effects of adding the surfactant in the reaction system on morphology, size and stability of the product prepared are studied with UV-visible spectrum. The results show that the addition of anionic and nonionic surfactants contributed to showing down silver mirror reaction; anionic surfactant system can gain 15 nm Au nanoparticle with certain dispersibility; nonionic surfactant system can gain 5~10 nm spherical Au nanoparticles with good dispersibility.

Key words: silver mirror reaction; Au nanoparticle; glucose; surfactant

(责任编辑: 张祖尧)