

KB 细胞耐药株的建立及其耐药机制的探讨

张晓红 张福荣 籍秀娟 李占荣

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所,北京 100050)

提要 用对长春新碱(VCR)敏感的 KB 细胞为亲本,通过诱变剂甲基磺酸乙酯刺激,然后在培养液中加入浓度递增的 VCR,得到耐药细胞株 KB_{V200}。此细胞株对 VCR 的耐受程度约为 KB 细胞的 175 倍。对其它抗肿瘤药物如紫杉醇、秋水仙碱和阿霉素等也有不同程度的交叉耐药性。进一步研究表明,KB_{V200}对³H-VCR 的蓄积明显减少,且耐药基因(mdr 1)表达增加。钙通道阻滞剂维拉帕米(Ver)可增加 KB_{V200}对³H-VCR 的蓄积和对 VCR 的敏感性。这些结果提示,KB_{V200}耐药的机制可能是由于 mdr 1 基因表达增加,产生过量的 p-糖蛋白,使药物外排增多所致。

关键词 KB 细胞;多药耐药;长春新碱;mdr 1 基因

肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是肿瘤治疗失败的重要因素之一。肿瘤细胞对多种药物产生耐药的原因相当复杂。由多药耐药基因(mdr 1 gene)引起的耐药只是其中一种,这种基因产物是一种膜糖蛋白——p-糖蛋白,它一旦与抗肿瘤药物结合,通过 ATP 提供能量,可以将药物泵出胞外,使细胞内药物浓度下降,从而表现出耐药现象。本文通过耐药细胞株 KB_{V200}的建立^(1~4),初步探讨了其耐药机制,并对耐药的逆转进行了研究,目的在于用此模型寻找能逆转耐药的化合物,以提高肿瘤化疗的疗效。

材 料 和 方 法

药品及试剂 抗肿瘤药物均为国产。甲基磺酸乙酯(EMS)为 Merck 公司产品。蓝四氮唑(MTT)为 Fluka 公司产品。³H-VCR,比活度为 2.3×10^{11} Bq · mmol⁻¹, Amersham 公司产品。³²P-dCTP,比活度为 1.1×10^{14} Bq · mmol⁻¹,福瑞公司产品。缺口翻译试剂盒为华美公司产品。

细胞及细胞培养条件 KB 细胞培养在含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液内置 37℃,5% CO₂ 温箱中培养。用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

耐药细胞株的建立 取对数生长期的 KB 细胞,用 200 μg · ml⁻¹诱变剂 EMS 处理 24 h,换正常培养液培养 5 d,然后逐渐增大 VCR 浓度,即可得到一系列对 VCR 耐受程度不等的耐药株。KB_{V200}是在 VCR 浓度为 200 nmol · L⁻¹时生长良好的耐药株。

MTT 法测药物的细胞毒作用⁽⁵⁾ 取对数生长期细胞,稀释至 $1.5 \sim 2 \times 10^4$ · ml⁻¹,于 96 孔细胞培养板中培养 1 d,加药,继续培养 4 d,弃去培养液,每孔加 0.5 mg · ml⁻¹的 MTT 100 μl,培养 4 h,弃去 MTT,每孔加 DMSO 150 μl,待溶解后于 Dynatech MR 700 型酶标仪 540 nm 处测吸收度。

细胞内药物蓄积的测定 取对数生长期细胞,稀释至每毫升培养液中含 8×10^5 个细胞,次日,弃去培养液,加 RPMI 1640 和 $^3\text{H-VCR}$ (4.6×10^{10} Bq) 培养 1 h,用 PBS(加 0.1% 曲拉通 $\times 100$) 洗 3 次,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶解细胞,10% 冰醋酸中和,液闪计数。逆转实验在加同位素的同时,加入逆转药物,其它步骤相同。

多药耐药基因表达水平的测定 按 Chomczynski P⁽⁶⁾ 报道的方法提取细胞总 RNA。将一定量的 RNA 样品与 37% 甲醛 20 μl 和 30 μl 20 \times SSC(20 \times SSC:氯化钠 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 柠檬酸钠 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0) 混合后,点样于硝酸纤维素膜上,与用缺口翻译法标记的多药耐药基因(mdr 1)探针进行杂交⁽⁷⁾(插入 mdr 1 CONA 片段的质粒 PHDR 5A 是由 NCI 的 M. Gottesman 提供),通过放射自显影显示多药耐药基因的表达水平。

结 果

耐药细胞株的建立

对 VCR 敏感的 KB 细胞,用 MTT 法测得其 IC_{50} 为 $6.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在培养液中加入 VCR $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,培养一段时间后,VCR 浓度逐渐递增至 4, 8, 10, 20, 30 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,随着 VCR 浓度的增加,培养周期延长。取处于对数生长期,在 VCR 浓度为 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 中生长的 KB 细胞,稀释至每毫升 1×10^5 个细胞,加入诱变剂 EMS $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,以后再逐渐增加 VCR 浓度,约半年时间,得到在 VCR 浓度为 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 中生长良好的 $\text{KB}_{\text{V}200}$ 。用 MTT 法测得其对 VCR 的 IC_{50} 为 $1152 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 VCR 的耐受程度约为 KB 细胞的 175 倍。如图 1。

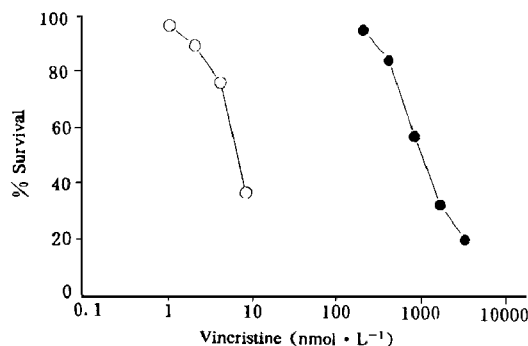


Fig 1 Dose-response curve of vincristine on the parental KB cell line (○) and $\text{KB}_{\text{V}200}$ (●) subline *in vitro*.

耐药细胞对几种抗肿瘤药物的交叉耐药性

耐 VCR 细胞株 $\text{KB}_{\text{V}200}$,对另外几种作用机理不同的抗肿瘤药物也有不同程度的交叉耐药性。用 MTT 法测得的结果如表 1 所示。 $\text{KB}_{\text{V}200}$ 对紫杉醇(taxol)的耐受程度是 KB 细胞的 156 倍,对秋水仙碱(Col)和阿霉素(ADM)的耐药性也约为 KB 细胞的 15 倍。但对高三尖杉酯碱(HH)、鬼臼乙叉甙(VP-16)及 5-氟脲嘧啶(5-FU)几无明显交叉耐药性。

Tab 1 Comparison of drug resistance in KB and KB_{V200} ($\bar{x} \pm s$)

Anticancer agent	IC ₅₀ (ng · ml ⁻¹) ^(a)		Relative resistance ^(b)	
	KB	KB _{V200}	KB	KB _{V200}
VCR	6.6 ± 0.7	1152 ± 11.5	1	175
Col	4.1 ± 0.5	62 ± 11.0	1	15
HH	9.7 ± 1.4	27 ± 13.0	1	2.8
Taxol	3.3 ± 0.6	516 ± 23.0	1	156
ADM	4.3 ± 1.4	62 ± 11.0	1	14.5
Vp-16	154 ± 8.6	790 ± 205	1	5
5-FU	268 ± 78.6	565 ± 48.5	1	2.1

(a) Average of duplicate trials; (b) Relative resistance of KB_{V200} is presented as IC₅₀ of each drug when IC₅₀ of KB was normalized as 1.0; Col; Colchicine; HH; Homoharringtonine; ADM; Adriamycin; Vp-16; Etoposide.

耐药细胞耐药机制的探讨

耐药细胞内药物蓄积的测定 与 KB 敏感株相比, 耐药株对³H-VCR 的蓄积明显减少。³H-VCR 加入 1 h, KB 细胞和 KB_{V200} 摄入量在 8×10^5 个细胞内分别为 4.02 ± 0.14 pmol 和 0.76 ± 0.03 pmol。由此可见, KB_{V200} 对³H-VCR 的蓄积约为 KB 细胞的五分之一。

RNA 分析 分别提取 KB 和 KB_{V200} 两种细胞的总 RNA, 分 3 个梯度 (20, 10 和 2.5 μg) 点到硝酸纤维素膜上, 与 mdrl 1 探针杂交, 结果如图 2 所示, 可以看到耐药细胞 KB_{V200} 中 mdrl 1 基因表达明显高于 KB 细胞。

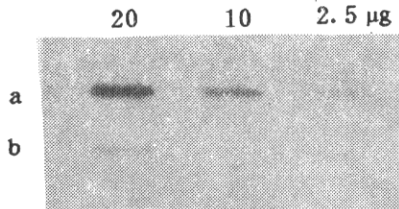


Fig 2 Slot blot analysis of mdrl 1 expression in (a) KB_{V200} and (b) KB cells.

Serial dilution of 20, 10 and 2.5 μg of total RNA were applied to each well.

耐药的逆转

维拉帕米(Ver)对 VCR 细胞毒作用的影响 VCR 对 KB_{V200} 的 IC₅₀ 为 $1152 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入浓度为 $2.5 \text{ μg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 Ver, 即可使 VCR 的浓度-存活曲线左移, 使其 IC₅₀ 降至 $253 \pm 2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KB_{V200} 对 VCR 的敏感性增加 3.5 倍; Ver 浓度升至 $5 \text{ μg} \cdot \text{ml}^{-1}$, IC₅₀ 降至 $55 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, VCR 的细胞毒性增加 20 倍; Ver $10 \text{ μg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, IC₅₀ 降为 $13.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使 VCR 的细胞毒性增加 84 倍(图 3)。结果表明, 上述浓度的 Ver 虽然可以明显逆转 KB_{V200} 对 VCR 的耐药性, 但并没有达到完全逆转的效果, 甚至 $10 \text{ μg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 Ver 也并没有使 KB_{V200} 对 VCR 的敏感程度降至相当 KB 细胞的水平。

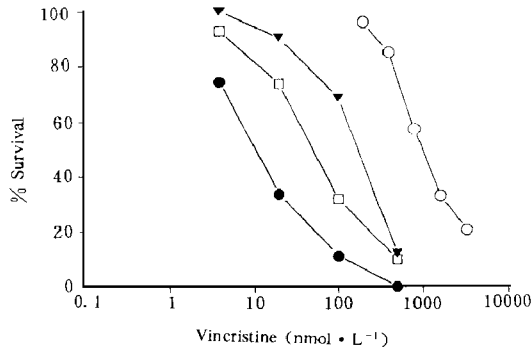


Fig 3 Cytotoxic effects of vincristine on KB_{v200} cells in the presence or absence of verapamil (○; 0; ▼; 2.5; □; 5.0; ●; 10 μg · ml⁻¹).

维拉帕米(Ver)对 KB_{v200}内药物蓄积的影响 前已表明,KB_{v200}对³H-VCR的蓄积只有敏感株KB细胞的五分之一,但Ver在5 μg · ml⁻¹就可使KB_{v200}对³H-VCR的蓄积超过KB细胞,达6.1 ± 0.16 pmol/8 × 10⁵个细胞,而Ver浓度为10 μg · ml⁻¹时,KB_{v200}对³H-VCR的蓄积达8.9 ± 0.1 pmol/8 × 10⁵个细胞,是KB细胞的2.2倍,即相当于无Ver存在时KB_{v200}对³H-VCR蓄积的11.7倍。

讨 论

Akiyama等⁽²⁾曾用KB细胞建立了一个对秋水仙碱(Col)耐药的细胞株KB-C₁。Kohno等⁽³⁾也用KB细胞建立了一个对长春新碱耐药的细胞株VJ-300,这两种细胞对VCR的耐药性都为KB细胞的400倍。但是,KB-C₁的多药耐药性不稳定,撤药后两个月,即可恢复到KB的敏感水平,而VJ-300却非常稳定。与这两种细胞相比,我们建立的耐药株KB_{v200}对VCR的耐受程度只为KB细胞的175倍,但较KB-C₁稳定。撤去VCR后培养3个月,VCR对KB_{v200}的IC₅₀仍为840 nmol · L⁻¹,即只有少许下降。

已经证明⁽⁸⁾,KB-C₁细胞中药物蓄积的减少主要是由于外排增加所致,这种外排作用是由于p-糖蛋白的参与。p-糖蛋白是一种能量依赖性药物外排泵,它参与耐药细胞内药物的外排已被证实⁽⁹⁾。Gerlach⁽¹⁰⁾认为p-糖蛋白是作为一种载体蛋白而发挥作用的,它上面有许多天然产物(包括抗肿瘤药物)的结合位点。对某种药物产生耐药,正是由于这种药物与p-糖蛋白上的结合位点结合,从而被p-糖蛋白排出细胞外所致。KB-C₁和VJ-300两种细胞中p-糖蛋白产生增加,并且编码p-糖蛋白的基因mdr 1基因表达也增加。我们已证明耐药株KB_{v200}中mdr 1基因有较高表达。因此,此耐药细胞株的耐药机制,可能也是由于p-糖蛋白过量表达导致药物外排的增多所致。

Tsuruo⁽¹¹⁾最先发现某些钙通道阻滞剂可以逆转耐药。Ver与抗肿瘤药物合用,可以增加抗肿瘤药物的细胞毒性,逆转耐药。这种作用是由于它与抗肿瘤药物竞争结合位点,充当p-糖蛋白作用的底物,代替药物被排出细胞外引起的⁽¹²⁾。我们的实验结果表明,Ver在10 μg · ml⁻¹时,虽可以使KB_{v200}对VCR的蓄积超过KB,却没有使KB_{v200}对VCR的敏感程度完全恢复到KB的水平。因此,KB_{v200}的耐药机制除p-糖蛋白参与外,还可能由其它机制,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Biedler JL, et al. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*, cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970;30 : 1174.
- 2 Akiyama S, et al. Isolation and genetic characterization of human KB line resistant to multiple drugs. *Somatic Cell Mol Genet* 1985;11 : 117.
- 3 Kohno K, et al. Vincristine-resistant human cancer KB cell line and increased expression of multidrug-resistance gene. *Jpn J Cancer Res* 1988;79 : 1238.
- 4 Shen DW, et al. Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin or vinblastine show changes in expression of specific proteins. *J Biol Chem* 1986;261 : 7762.
- 5 Scudiero DA, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988;48 : 4827.
- 6 Chomczynski P, et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162 : 156.
- 7 Sambrook J, et al. Molecular cloning. Second edition. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 : 9.52~9.55.
- 8 Fojo A, et al. Reduced drug accumulation in multiple drug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1985;45 : 3002.
- 9 Cornwell MM, et al. Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150— to 170— KDa protein detected by photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83 : 3847.
- 10 Gerlach JH, et al. Homology between *p*-glycoprotein and a bacterial hemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature (Lond.)* 1986;324 : 485.
- 11 Tsuruo T, et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vitro* and *in vivo* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981;41 : 1967.
- 12 Safa AR, et al. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as acceptor for calcium channel blockers. *J Biol Chem* 1987;262 : 7884.

VINCRIStINE-RESISTANT HUMAN KB CELL LINE AND MECHANISM OF MULTIDRUG RESISTANCE

XH Zhang, FY Zhang, XJ Ji and ZY Li

(Institute of Materia, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT A multidrug-resistant(mdr) clone of human cancer KB cells was isolated by step-wise selection on exposure to increasing doses of vincristine. The final clone, KB_{v200}, obtained after ethylmethane sulfonate (EMS) mutagenesis showed 175-fold higher resistance to vincristine than did KB cells. The cells were also cross-resistant to taxol, colchicine and adriamycin.

Cellular accumulation of vincristine in KB_{v200} was decreased to less than one-fifth of that in KB. To determine the presence of mdr 1 mRNA in KB_{v200} and KB, total cellular RNAs from each cell line were analyzed by means of slot blot hybridization. The result showed that the mdr 1 gene had been highly expressed in KB_{v200}.

In addition, verapamil, a calcium channel blockers, was shown to increase VCR accumulation in KB_{v200} and reverse the vincristine resistance. All these results demonstrate that the mechanism of KB_{v200} cell resistance to multiple drugs resulted from increased expression of mdr 1 gene and brought about over production of *P*-glycoprotein and increased the efflux of drugs.

Key words KB cells; Multidrug resistance; Vincristine; Mdr 1 gene