

人卵巢癌细胞阿霉素耐药株的建立及其耐药机制的探讨

李佩茵 林 晨

(中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100021)

摘要 人卵巢癌阿霉素耐药细胞株是用 A2780 人卵巢癌细胞株作亲本, 获得的能耐受 $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ADM 的细胞株 A2780/ADM。此细胞株对 ADM 的耐受程度约为 A2780 细胞的 17 倍。对其他抗肿瘤药如长春新碱、鬼臼乙叉甙有明显的交叉耐药, 对 5-氟脲嘧啶、顺铂、米尔法兰则无明显交叉耐药性。进一步研究表明耐药株对 ADM 蓄积明显减少; 免疫细胞化学的研究显示, A2780/ADM 细胞中 P-170 膜蛋白和谷胱甘肽 S-转移酶(GST- π)均较 A2780 表达高。对耐药的逆转也进行了初步研究, 发现维拉帕米与 ADM 合用能提高 A2780/ADM 细胞对 ADM 的药物敏感性, 细胞的耐受性得到部分逆转。

关键词 人卵巢癌阿霉素耐药细胞株; 多药耐药; 倍增时间; P-糖蛋白

耐药是肿瘤化疗成功的重大障碍, 某些肿瘤具有固有耐药性特点, 另一些肿瘤则在化疗后产生获得性耐药。阿霉素(adriamycin, ADM)是一种有效的蒽环类抗癌抗生素, 被广泛用于包括卵巢癌在内的多种肿瘤的治疗。肿瘤细胞对多种药物产生耐药的原因相当复杂。体外培养的耐药细胞株对肿瘤耐药机制的研究是国内外一活跃内容。本文通过耐药细胞株 A2780/ADM 的建立, 初步探讨了其耐药机制, 并对耐药的逆转进行了研究, 目的在于用此模型进一步寻找能逆转耐药的化合物以提高肿瘤化疗的疗效。

材 料

细胞 A2780(人卵巢癌细胞株, 由中国医学科学院药物研究所赠送, 药物所引自美国)。

药品 阿霉素(ADM)为意大利 Farmitulia 产品; 顺铂(DDP); 山东齐鲁制药厂; 5-氟脲嘧啶(5-Fu); 上海海普制药厂; 长春新碱(VCR); 北京医科大学实验药厂; 鬼臼乙叉甙(VP-16); 北京医药工业研究所; 米尔法兰(melphalan, Mel); Sigma 产品; 维拉帕米(Ver); 辽宁锦州制药二厂。

试剂 单克隆抗体 JSB-1, 识别 mdr-1 产物 P-170 膜蛋白, 由荷兰 RJ Schepers 教授惠赠; GST- π 由军事医学科学院提供; ABC 试剂盒系 Vector 产品。

方 法 和 结 果

耐药细胞株的建立

选用接种 48 h 后处于指数生长期的 A2780 细胞, 用浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 ADM 反复处理。待生长稳定后, 逐步增加 ADM 的浓度, 开始时 2~3 周增加一倍的剂量, 以后逐渐递增 ADM 的浓度, 共培养 10 个月。约传代 50 次后, 得到一耐受 ADM 浓度为 $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的生长良好的耐药细胞株, 命名为 A2780/ADM, 该细胞株已反复传代 3 个月。

A2780/ADM 生物学特性

细胞株稳定性 细胞在不含 ADM 的培养液中培养,随着时间的延长,其耐受性会逐渐降低⁽¹⁾(见表 1)。

Tab 1 Comparison of drug resistance in A2780 and A2780/ADM cells

Anticancer agent	IC ₅₀ (μg · ml ⁻¹) ^(a)			Relative resistance ^(b)	
	A2780	A2780/ADM	50 days after removal drug	A2780/ADM	50 days after removal drug
ADM	0.013	0.22	0.123	17	9.5
VCR	0.0066	0.054	0.02	8.1	4.43
VP-16	0.14	0.77	0.39	5.5	2.82
5-Fu	0.50	0.53	0.41	—	—
Mel	1.23	0.80	0.53	—	—
PDD	0.74	0.24	0.35	—	—

(a) Average of duplicate trials; (b) Relative resistance of A2780/ADM is presented as IC₅₀ of each drug when IC₅₀ of A2780 was normalized as 1. 0. VCR; Vincristine; VP-16; Etoposide; 5-Fu; 5-Fluorouracil; Mel; Melphalan; PDD; Cis-platinum.

群体倍增时间(TD)的测定⁽²⁾ 每瓶接种细胞为 4×10^4 个,接种后 1~7 d,每天取 2 瓶计细胞总数,在半对数座标纸上绘制生长曲线,按 Patlerson 氏公式计算细胞在指数生长期的 TD。结果表明,A2780 和 A2780/ADM 细胞的倍增时间分别为 26.3 h 和 43.8 h,耐药细胞的生长速度显然比敏感细胞缓慢。

集落形成率 选用指数生长期细胞制成单细胞悬液,接种在 35 mm 平皿中,置于 37℃,5% CO₂ 湿箱,A2780 培养 10 d,A2780/ADM 培养 18 d。培养结束,用甲醇固定结晶紫染色,计集落总数。结果 A2780/ADM 集落形成率为 15~20%,A2780 集落形成率为 65~75%。

药物敏感性实验 按 Hamburger 和 Salmon^(3,4) 报道的集落形成法测定。癌细胞接种 16 h 后,加入药物,各种药设 5~6 个剂量组,每组 3 个平皿。药物处理 24 h 后,除去药物,用生理盐水洗涤,以中止药物的作用。换新鲜 1640 培养液后继续培养 10~18 d,计集落形成率。以给药组的集落形成率与对照组集落形成率之比的百分数,计算每种药物浓度的细胞存活率。以存活率为纵座标,药物浓度为横座标,在半对数座标纸上作剂量-存活率曲线,并求出半数抑制剂量 IC₅₀。由图 1 可看到 ADM 对 A2780 细胞作用的 IC₅₀ 为 0.013 μg · ml⁻¹,而 A2780/ADM 则为 0.222 μg · ml⁻¹,即该耐药细胞对 ADM 的耐受能力为敏感株的 17 倍(见图 1)。

交叉耐药实验 结果表明,耐 ADM 细胞株 A2780/ADM 对其他几种作用机理不同的抗肿瘤药也有不同程度的交叉耐药性(见表 1)。A2780/ADM 对长春新碱(VCR)和鬼臼乙叉甙(VP-16)的耐药程度分别是 A2780 的 8.1 倍和 5.5 倍;但 A2780/ADM 对 5-氟脲嘧啶(5-Fu)、米尔法兰(Mel)和顺铂(PDD)并无明显的交叉耐药性。

细胞内阿霉素聚积量^(5,6)

取指数生长期细胞接种 48 h 后,分别加入 2,4,8,12,16 μg · ml⁻¹ ADM,每一剂量 3 瓶。1.5 h 后用冰冷 PBS 洗涤,收集细胞并计数;在细胞中加入 1:1 混合的 0.3 mol · L⁻¹ HCl 和 50% 乙醇,-20℃ 过夜,提取细胞内 ADM。次日置于 4℃ 12000 r · min⁻¹,离心 30 min 收集上清液。在 RF-510 荧光分光光度计上测 ADM 的荧光强度(激发波长和发射波长分别为 470 nm 和 548 nm)。由图 2 可见,两种细胞内 ADM 的聚积量均随细胞外药物浓度的升高而增加。耐

药细胞内 ADM 的量低于亲代细胞,统计学有显著差别($P < 0.05$)(见图 2)。

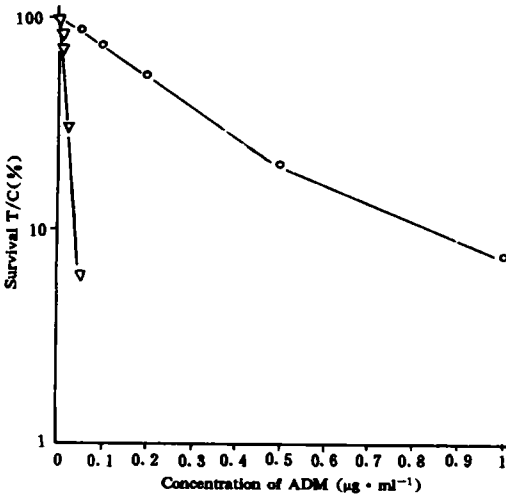


Fig 1 Dose-response curve of ADM in parental A2780 cell line and A2780/ADM subline *in vitro*. ○—○ A2780/ADM; △—△ A2780.

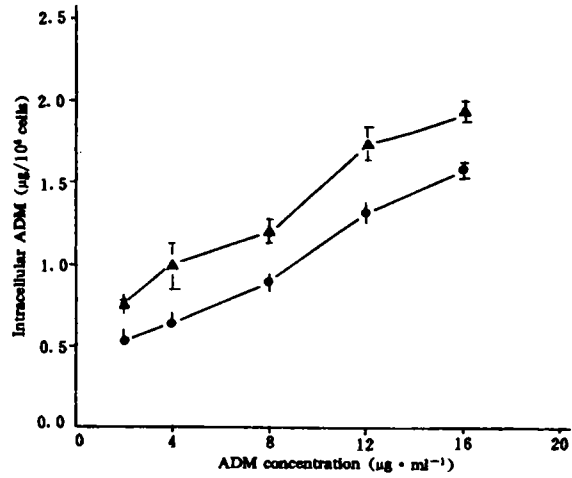


Fig 2 Intracellular ADM accumulation in the parental A2780 cell line and A2780/ADM subline (1.5 h after exposure to ADM). ADM concentration 12 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 16 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ $P < 0.05$. ●—● A2780/ADM; ▲—▲ A2780.

耐药机理

用免疫细胞化学测定蛋白产物 P-170 和 GST- π ^[7]。将细胞接种在载玻片上,24 h 后取出,再用 PBS 冲洗。冷丙酮固定 15 min,用 PBS 冲洗,1% 马血清封闭 30 min,甩片,加一抗(抗 mdr-1 单抗,JSB)室温作用 1 h 后,用 PBS 冲洗,加二抗(马抗鼠抗体)37°C 1 h,洗片;加 ABC(卵白素—生物素—酶复合物法)反应复合物,37°C 0.5 h,用 PBS 冲洗后加 DAB(3,3 二氨基联苯胺显色。当一抗为 JSB-1 时,A2780 为阴性,A2780/ADM 为弱阳性。表示细胞经 ADM 诱导耐药后,有 mdr-1 基因产物 P-170 的表达。用 GST- π 作为一抗时的免疫细胞化学的结果显示 A2780 为弱阳性,A2780/ADM 为阳性,表明耐药细胞的胞内谷胱甘肽 S-转移酶有所增多。

耐药的逆转

维拉帕米(Ver)对 ADM 在 A2780/ADM 细胞毒作用的影响:用集落形成法测定,ADM 对 A2780/ADM 作用 24 h 后的 IC_{50} 为 0.222 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,ADM 和 Ver 联合作用 24 h 后,可使 ADM 对该耐药株的药物敏感性增强,使其 IC_{50} 降到 0.026 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,即 ADM 的细胞毒性增加 7.5 倍。结果表明,上述浓度的 Ver 可以明显地逆转 A2780/ADM 对 ADM 的耐药性,但并没有达到完全逆转的效果(图 3)。

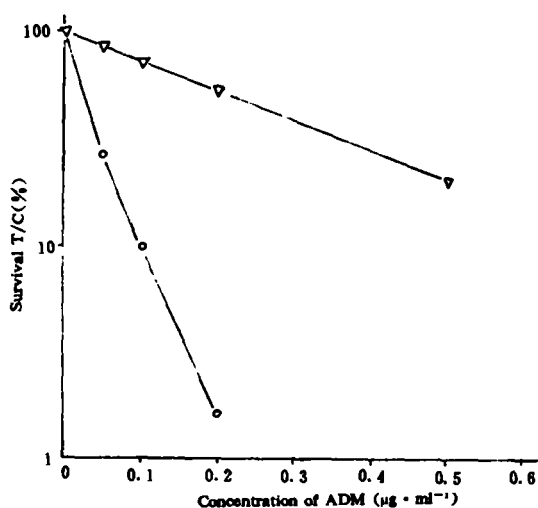


Fig 3 Effect of verapamil on ADM cytotoxicity to A2780/ADM cells. \triangle — \triangle ADM; \circ — \circ Ver+ADM.

讨 论

在有关抗癌药物耐药性的文献中,报道典型的多药耐药 MDR 和 P-糖蛋白有关,涉及的药物包括蒽环类、长春碱类、表鬼臼毒素类、秋水仙素和放射菌素等疏水性天然性产物。而烷化剂和抗代谢类药物则不产生 MDR。从本文两种细胞株对不同抗癌药物的敏感性的分析表中可看出, A2780/ADM 细胞对 VP-16 及 VCR 有明显的交叉耐药作用,对 PDD 和 Mel 有伴随敏感性,说明此耐药细胞是由 P-糖蛋白参与的典型 MDR。A2780/ADM 细胞内 ADM 的聚集量较亲代细胞降低,可能与细胞膜的 P-糖蛋白过量表达,将药物泵出细胞外有关^[8,9]。Ver 是一种钙通道阻滞剂,可通过竞争抗癌药物 P-糖蛋白的结合位点来达到抑制 P-糖蛋白将药物泵出的功能^[10,11]。本研究表明 Ver 和 ADM 合用可以增加 A2780/ADM 细胞对 ADM 的敏感性而逆转耐药,也同样证明了这一点。

使用抗 P-170 单抗 JSB-1 对 A2780/ADM 和 A2780 的细胞内 P-糖蛋白进行免疫组化,发现 A2780/ADM 呈阳性,证实 A2780/ADM 耐药细胞中含有 P-糖蛋白。此外,用抗谷胱甘肽 S-转移酶(GST- π)单抗进行的免疫组化实验显示 A2780/ADM 细胞中 GST- π 的表达超过 A2780 细胞,说明 A2780/ADM 细胞的耐药除了 P-糖蛋白参与之外,还有其他机制,谷胱甘肽解毒途径有关的酶表达增多,可能也是一个重要原因,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Tsuruo T, Lida-Saito H, Kawabata H *et al.* Characteristics of resistance to adriamycin in human myelogenous leukemia K562 resistant to adriamycin and in isolated clones. *Jpn J Cancer Res (Gann)*, 1986, 77: 682
- 2 Jakoby WB. *Methods in Enzymology*. Vol LVIII. London; Academic Press Inc, 1979: 150
- 3 Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 1977, 197: 461
- 4 李学汤, 林晨, 李佩茵等. 七种人癌细胞系对冬凌草甲素的敏感性比较. *药理学报*, 1985, 20: 243
- 5 He QY. Reversal of doxorubicin resistance by tetrandrine in Chinese hamster ovary cell line. *Acta*

Pharmacol, 1992, 13: 416

- 6 Zijlstra JG, Vries EGE, Mulder NH. Multifactorial drug resistance in an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 1987, 47: 1780
- 7 杨景山主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 中国协和医科大学联合出版社, 1990: 105~113
- 8 Brasley G, Bradley G, Juranka PF *et al.* Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 948: 87
- 9 Kay SB. The multidrug resistance phenotype. *Br J Cancer*, 1988, 58: 691
- 10 Yusa K, Tsuruo T. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil; Direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res*, 1989, 49: 5002
- 11 Qian XD, Beck WT. Binding of an optically pure photoaffinity analogue of verapamil, LU-49888, to P-glycoprotein from multidrug-resistant human leukemic cell lines. *Cancer Res*, 1990, 50: 1132

ESTABLISHMENT OF ADRIAMYCIN-RESISTANT HUMAN OVARIAN CARCINOMA CELL LINE AND ITS MECHANISM OF MULTIDRUG RESISTANCE

PY Li and C Lin

(Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

ABSTRACT A multidrug-resistant cell line (A2780/ADM) of human ovarian carcinoma which can resist $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of adriamycin (ADM) was obtained by step-wise selection exposure to increasing doses of ADM. A2780/ADM cells showed 17-fold higher resistance to ADM than A2780 cells.

The doubling times were 43.8 h in A2780/ADM and 26.3 h in A2780 cells. Colony formation rates were 15%~20% in A2780/ADM and 65%~75% in A2780 cells. A2780/ADM cell line was also shown to significantly cross-resistant to vincristine (VCR) and VP-16, but no cross-resistance was found to 5-Fu, PDD or Mel.

A further investigation showed that intracellular accumulation of ADM in A2780/ADM was significantly decreased. Expressions of P-glycoprotein and GST- π were increased in A2780/ADM by means of immunohistochemical method. Verapamil (Ver) combined with ADM was found to increase the sensitivity and reverse the resistance to ADM in A2780/ADM. This study indicates that A2780 ADM has the peculiarity of multidrug resistance and there may be other mechanism of drug-resistance besides MDR related to P-170.

Key words A2780/ADM; Multidrug-resistance; Doubling time; P-glycoprotein