

人乳腺癌多药耐药细胞系 MCF-7/MDR^a 的建立 及其生物学特性的初步研究

严 婷 张莲芬 张熔熔¹ 冯 磊 金 坚*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036; ¹无锡第二人民医院, 无锡 214002)

摘要 实验以 MCF-7 细胞株为亲本细胞, 采用阿霉素(ADM)低浓度持续加量诱导法建立了多药耐药的人乳腺癌细胞系 MCF-7/MDR^a, 并对其耐药谱、动力学周期分布、表型变化、药物的蓄积量等生物学特性进行了初步分析评价。结果表明, MCF-7/MDR^a 细胞较亲本细胞的 ADM 半数致死浓度(IC_{50})高 500 倍, 撤药培养 150 天后耐药指数仍维持在 200 倍以上, 并对多种化疗药物产生交叉耐药性; 耐药细胞分化程度低于同步传代的 MCF-7 细胞, 细胞倍增时间与亲本细胞接近, S 期细胞显著增加, G₁ 期细胞减少; 随着撤药时间的延长, 细胞的增殖速度加快; 耐药细胞 P-gP、LRP 和 GST π 的表达水平较亲本细胞有显著增加, ER 阳性表达丢失; 在稳定生长的撤药培养 6 天的细胞中仍有 ADM 蓄积。建立的 MCF-7/MDR^a 模型具有多药耐药细胞的基本生物学特性, 可用于肿瘤多药耐药机制的研究。

关键词 乳腺癌; 细胞系 MCF-7/MDR^a; 阿霉素; 多药耐药

乳腺癌具有发病率高、侵袭性、病程进展缓慢、自然生存期长等特点, 是女性最常见的恶性肿瘤之一。在乳腺癌的综合治疗中, 化疗占有十分重要的地位, 临幊上许多肿瘤患者在经历了数次有效的化疗后, 最终难免复发, 其主要原因是肿瘤细胞对化疗药物产生了多药耐药性能(multidrug resistance, MDR)^[1-4], 即肿瘤细胞接触一种肿瘤药物并产生耐药性后, 并对结构和作用机制不同的多种抗肿瘤药物具有交叉耐药性。迄今对 MDR 机制尚未真正明确, 但主要认为 MDR1/P-gp 是最主要的耐药机制^[5]。因此在对如何解决多药耐药问题上, 目前的研究也是主要集中在把 MDR1/P-gp 作为耐药逆转靶点进行逆转药物的筛选。Batist 等^[6]建立了耐阿霉素(adriamycin, ADM)人乳腺癌细胞模型 Adr^RMCF-7, 耐药指数约为 192 倍, 已被国内引进, 但该模型的生物学评价体系并不完整。因此, 我们将引自 ATCC 的 MCF-7 细胞重新建立新的耐药倍数较高的模型 MCF-7/MDR^a, 并对其生物学特性进行较完整的评价, 以期对临床用药及耐药逆转研究起到引导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺细胞系 MCF-7 引自 ATCC 公司。RPMI 1640 为 Gibco 公司产品。胰蛋白酶、DMSO 和小牛血清为华美生物工程公司产品。胰岛素注射液为上海生物化学制药厂产品。人 P-gP、肺耐药相关蛋白(LRP)、DNA 拓扑异构酶 II(ToPoII)、还原型谷胱甘肽转移酶(GST π)、雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)免疫组化试剂盒均为福州迈新生物技术公司产品。ADM 和碘酰罗丹明 B (sulfor rodamine B, SRB) 为 Sigma 公司产品。药品博来霉素、表柔比星、米托蒽醌、羟喜树碱、依托泊苷、硫酸长春新碱、丝裂霉素、长春瑞滨、塞替派、吡柔比星、甲氨蝶呤、吉西他滨、顺铂、卡铂分别购自日本化药株式会社、浙江海正药业股份有限公司、江苏恒瑞医药股份有限公司等, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养条件 MCF-7 细胞于 37 °C、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中无菌培养(Thermo Forma 公司)。培养液为含 10% 热灭活的小牛血清、0.4% 胰岛素、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2006-04-10

* 通讯作者。Tel: 0510-85860236, Fax: 0510-85860236, E-mail: jinjian31@hotmail.com

的完全 RPMI 1640 细胞培养基。细胞传代时用含 0.25% 胰蛋白酶进行消化。

1.2.2 MCF-7/MDR^a 的建立 采用低浓度加量持续诱导法^[7]诱导亲本 MCF-7 细胞株。以 ADM 对亲本 MCF-7 IC₅₀ 的 1/10 为起始浓度, 逐步提高细胞培养液中的 ADM 浓度, 待每个 ADM 浓度时细胞稳定生长后再逐步提高药物浓度, 同步监测 ADM 对细胞的 IC₅₀。

1.2.3 形态学观察 用倒置显微镜和扫描电镜观察细胞的 MCF-7/MDR^a、撤药细胞和亲本 MCF-7 形态变化。

收集培养的 MCF-7/MDR^a 和亲本 MCF-7, 在经多聚赖氨酸预处理过的载玻片上涂成单层细胞, 甲醇固定 10 min, 清水冲洗两次后将细胞进行常规苏木素 - 伊红(H.E.)染色。

扫描电镜样品制备: 样品 800 r/min 离心 5 min 后置于 4 ℃下用 2.5% 戊二醛固定, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗数次后 800 r/min 离心 5 min, 用 1% 四氧化锇固定, 继续用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗数次 800 r/min 离心 5 min, 在室温下依次用 30%、50%、70%、90% 和 100% 的乙醇梯度脱水, 置于醋酸异戊酯过渡, 临界点干燥(CPD-030 BAL-TEC 公司), 离子溅射(SCD-005 BAL-TEC 公司), 最后用扫描电镜观察(QUANTA-200 FEI 公司)。

1.2.4 生长曲线、倍增时间测定 分别收获对数生长中期、生长状态良好的亲本 MCF-7 细胞和 MCF-7/MDR^a 细胞, 96 孔板(Costar 公司)每孔接种 7×10³ 个细胞, CO₂ 培养箱中常规培养。从第 2~6 天采用 SRB 法^[8]分别测定细胞生长情况, 根据 Patterson 公式计算细胞在对数期的倍增时间(T_d), T_d (h)= Tlg2/ lg (N_t/ N₀)。T 为对数增殖期时间(h), N_t 为对数增殖期结束时的细胞数, N₀ 为对数增殖期开始时的细胞数。

1.2.5 细胞 MDR 检测 采用 SRB 法分别检测亲本 MCF-7 和 MCF-7/MDR^a 对药物的敏感性。96 孔板每孔接种 7×10³ 个细胞, 培养 24 h 后加入不同浓度的化疗药, 每个浓度设 4 个复孔, 培养 72 h。SRB 法细胞染色, 酶标仪(Multiskan MK3, Thermo LabSystems 公司)测量 A₅₄₀, 按下式计算抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{\text{对照孔 } A \text{ 值} - \text{加药孔 } A \text{ 值}}{\text{对照孔 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

确定各种化疗药的 IC₅₀, 按下式计算耐药指数(resistance factor, RF):

$$RF = \frac{\text{耐药型细胞(MCF-7/MDR}^a\text{) } IC_{50}}{\text{野生型细胞(MCF-7) } IC_{50}}$$

将 MCF-7/MDR^a 细胞撤药后常规培养并传代, 跟踪检测对 ADM 的 IC₅₀, 求出 RF 值。

1.2.6 流式细胞术(FCM)分析细胞周期分布 分别收集调整周期后同步培养的 MCF-7/MDR^a 和亲本 MCF-7 细胞(1×10⁶ 个/ml), PBS 洗涤 2 次, 70% 冷乙醇固定过夜。PI 染液冰浴 30 min 后, 用美国 Coulter 公司的 EPICS XL 型流式细胞仪分析。

1.2.7 免疫组化分析 收集培养的 MCF-7/MDR^a 和亲本 MCF-7, 在经多聚赖氨酸预处理过的载玻片上涂成单层细胞, 甲醇固定 10 min, 清水冲洗两次, 高压修复。按试剂盒说明书进行 P-gP、LRP、ToPoII、GSTπ、ER 和 PR 的免疫组化分析。

1.2.8 细胞内 ADM 聚积量的测定 收集撤药培养 6 天的 MCF-7/MDR^a 细胞 2×10⁶ 个, PBS 冲洗 3 次, 加入蒸馏水 1 ml, 反复冻融使细胞破裂, 混匀。高速冷冻离心(1-15K, Sigma 公司)12 000 r/min 离心 30 min, 上清液经冷冻干燥(EZ585-Q, FTS 公司)后复溶于 0.5 ml 三蒸水中。在加压毛细管电色谱仪上(TriSepTM2100GV, 上海通微分析技术有限公司), 采用激光诱导荧光检测器, 激发波长 473 nm, 发射波长 520 nm, 在如下色谱条件测 ADM 的荧光强度。

色谱柱选择 EP-100-20/45-3-C18 柱; 流动相为 (CH₃OH : ACN : 0.01 mol/L NH₄H₂PO₄ : HAc = 50 : 22 : 28 : 0.5) 体系; 泵流速为 0.02 ml/min; 进样量为 20 nl; 电压为 -2 kV; 压力为 2 000 psi。

1.3 统计方法

采用 SPSS10.0 统计软件, 作 t 检验分析 P 值。

2 结果

2.1 MCF-7/MDR^a 细胞模型的 RF

以递增 ADM 浓度体外连续培养 30 周, MCF-7/MDR^a 细胞在含 5 μg/ml ADM 的完全 1640 培养液中生长良好。SRB 法分析表明 MCF-7/MDR^a 细胞对 ADM 的 IC₅₀ 为亲本 MCF-7 细胞的 500 倍; 撤去 ADM 继续培养 30 天后 RF 为 475 倍, 60 天后为 230 倍, 并趋于稳定(图 1)。

2.2 MCF-7/MDR^a 细胞模型的形态学分析

MCF-7/MDR^a 细胞、撤药型 MCF-7/MDR^a 细胞和同步传代的亲本 MCF-7 细胞经苏木素 - 伊红(H.E.) 染色后在镜下形态差异明显。亲本 MCF-7 细胞形态一致、大小均匀, 呈团状生长趋势, 核分裂相少;

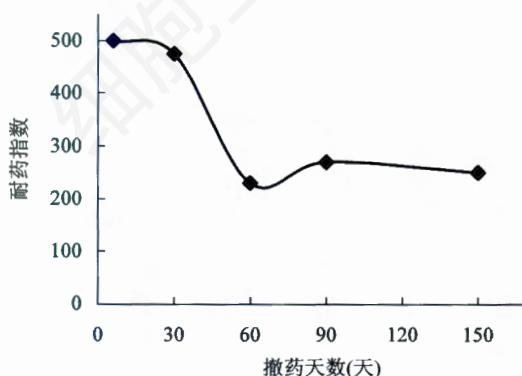


图1 撤药天数-耐药指数关系曲线

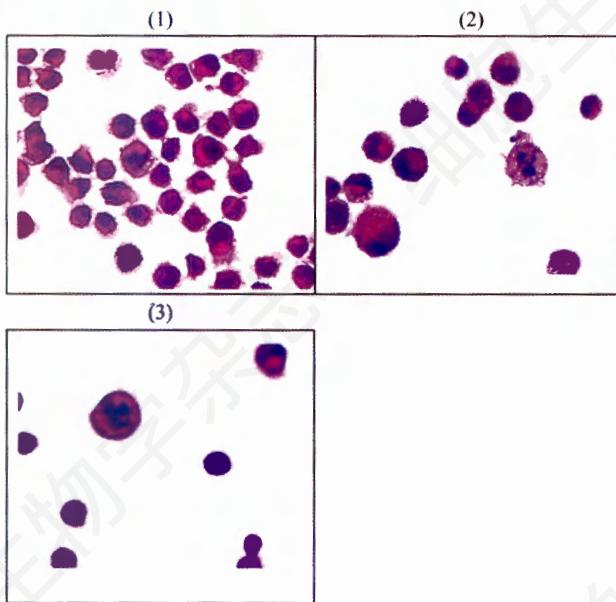


图2 三种细胞H.E.染色后的光镜照片(400×)

(1) MCF-7 细胞; (2) MCF-7/MDR^a 细胞; (3) 撤药型 MCF-7/MDR^a 细胞。

MCF-7/MDR^a 细胞大小不一, 核分裂相增多, 部分细胞幼稚、细胞明显增大, 且呈片状生长趋势; 撤药型 MCF-7/MDR^a 细胞病理性核分裂增多, 细胞大小不一, 幼稚细胞较多(图 2)。

在扫描电镜照片下观察细胞形态的变化(图 3), 亲本 MCF-7 细胞相邻近的两个细胞大小相近, 细胞呈球状, 轮廓较规整, 细胞的表面可见大量分布均匀的细长微绒毛样突起, 偶见少数大小不一的小球状隆起, 散在分布; 耐药细胞分散排列, 细胞呈球状, 轮廓较规整, 细胞表面近 1/4 区域呈现大量分布均匀的细长的微绒毛样突起, 其余部分可见密集的大小不一的小球状突起, 两者之间呈局部交错状, 提示小球状隆起可能由绒毛样突起膨胀形成; 撤药 30 天培养的细胞大小不一, 细胞轮廓为不规则长

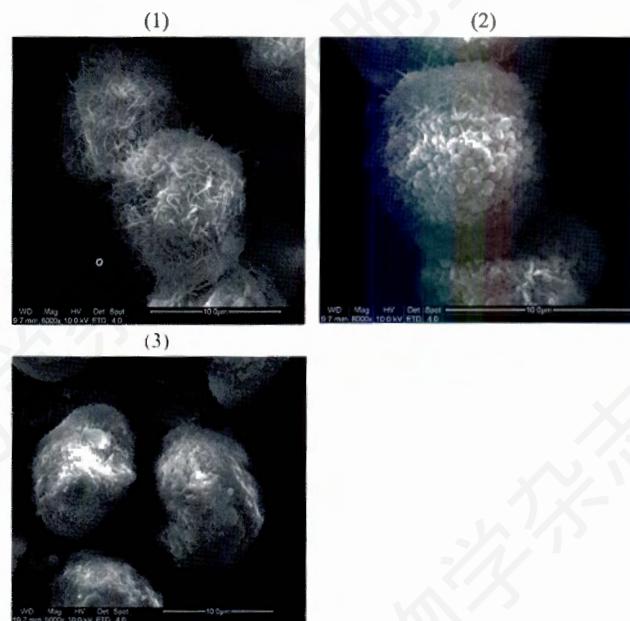


图3 三种细胞的扫描电镜照片

(1) MCF-7 细胞; (2) MCF-7/MDR^a 细胞; (3) 撤药型 MCF-7/MDR^a 细胞。

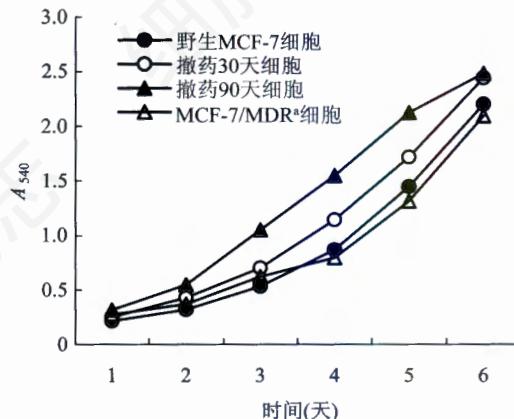


图4 四种不同细胞的生长曲线

圆形, 细胞表面部分区域的绒毛样突起消失, 大部分区域布满形状多样、高低不一的扁平样或高度褶状隆起, 但有相互融合的现象, 提示后者可能是由小球状隆起彼此融合形成。

2.3 MCF-7/MDR^a 细胞的生长情况

耐药细胞 T_d ($T_d: 28.8 \text{ h} \pm 0.41 \text{ h}$) 与其亲代差别不大 ($T_d: 29.2 \text{ h} \pm 0.32 \text{ h}$, $P > 0.05$), 但撤药细胞其 T_d 明显减少(撤药 30 天: T_d 为 $19.2 \text{ h} \pm 0.25 \text{ h}$, 撤药 90 天: T_d 为 $14.4 \text{ h} \pm 0.36 \text{ h}$, 与亲本细胞相比 $P < 0.01$), 说明后者生长速度快于前两者, 且随着撤药时间延长生长速度越快(图 4)。在低营养条件下 (0.5% 小牛血清), 撤药细胞的生长状态优于耐药细

表 1 细胞周期分析

细胞周期	MCF-7	MCF-7/MDR ^a	撤药 30 天细胞	撤药 60 天细胞	撤药 90 天细胞
G ₁ %	50.8	30.3*	51.5	51.0	48.8
S%	28.8	44.3*	24.8	27.1	27.6
G ₂ %	20.5	25.3	23.7	21.9	23.6

* 表示与亲本 MCF-7 细胞相比差异显著($P < 0.05$)，无标记则表明差异不显著。

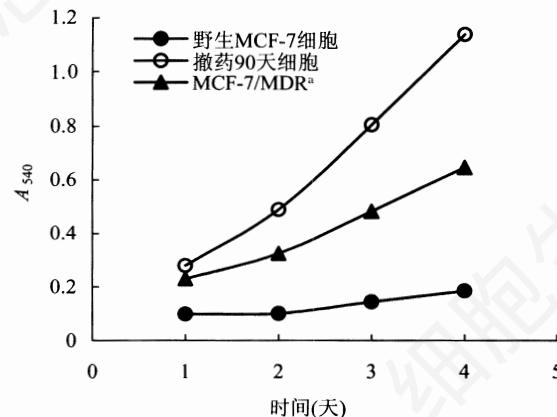


图 5 0.5% 小牛血清浓度下生长曲线

胞，而亲本 MCF-7 细胞几乎不生长(图 5)。分析细胞周期分布发现，MCF-7/MDR^a 细胞主要处于 S 期，而 MCF-7 细胞大多聚积在 G₁ 期；撤药培养后，细胞周期有重新回复至亲本细胞的趋向(表 1)。

2.4 MCF-7/MDR^a 细胞模型的 MDR

SRB 法分析显示，MCF-7/MDR^a 模型对博来霉素、表柔比星等另外 11 种临幊上常用的乳腺癌化疗药可产生不同程度的耐药，对顺铂、卡铂和甲氨喋呤无明显耐药性(表 2)。

2.5 MCF-7/MDR^a 细胞的生化标志物

免疫组化分析表明，P-gP 在耐药细胞中的阳性表达率显著高于亲本细胞，ER 在耐药细胞中明显丢失；LRP 和 GST π 在耐药细胞中的阳性表达比亲本 MCF-7 略高(表 3)。

2.6 MCF-7/MDR^a 细胞内 ADM 的蓄积量

毛细管电色谱激光诱导荧光检测器检测细胞内 ADM 含量发现，MCF-7/MDR^a 耐药细胞中的 ADM 含量为 $10.57 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ 个细胞}$ 。

3 讨论

ADM 是目前临幊上常用的乳腺癌化疗药物，其作用机制是嵌入 DNA，干扰转录。应用 ADM 诱导建立人乳腺癌 MDR 细胞模型具有良好的代表性。我们采用低浓度加量持续诱导法建立的 MCF-7/MDR^a 模型，其 RF 达 500；进一步研究发现，撤

表 2 MCF-7/MDR^a 细胞耐药性分析($\bar{x} \pm s$)

药物	$IC_{50} (\mu\text{g}/\text{ml})$		RF
	MCF-7	MCF-7/MDR ^a	
博来霉素	0.4 ± 0.023	30 ± 0.13	75
表柔比星	2 ± 0.121	142 ± 0.421	71
米托蒽醌	1 ± 0.012	48 ± 0.035	48
羟喜树碱	0.007 ± 0.001	0.98 ± 0.021	14
依托泊苷	10 ± 0.043	120 ± 0.317	12
硫酸长春新碱	0.62 ± 0.024	6.2 ± 0.367	10
丝裂霉素	2 ± 0.0258	12 ± 0.0489	6
长春瑞滨	0.64 ± 0.0257	4 ± 0.0341	6
塞替派	3.8 ± 0.012	18.2 ± 0.11	4.8
吡柔比星	0.15 ± 0.011	0.64 ± 0.022	4.3
吉西他滨	0.09 ± 0.021	0.3 ± 0.015	3.3
顺铂	1.4 ± 0.0148	2.6 ± 0.0257	1.9
卡铂	34.5 ± 0.214	45.8 ± 0.156	1.3
甲氨喋呤	0.01 ± 0.0011	0.01 ± 0.0011	1

表 3 P-gP、LRP、ToPoII、GST π 、ER、PR 在两株细胞中的阳性表达

	MCF-7	MCF-7/MDR ^a 细胞
P-gP	7%	80%
LRP	2%	10%
ToPoII	80%	80%
GST π	45%	65%
ER	30%	—
PR	70%	60%

“—”为无阳性表达。

药不同时间细胞培养的 RF 在前 60 天内下降明显，60 天后模型细胞的 RF 趋于稳定，基本维持在 200 倍以上。说明本文建立的细胞模型能将抗 ADM 的表型稳定传代，可用于作为 MCF-7 耐药研究的基础材料，同时也提示有两种可能性存在：第一，MCF-7 诱导产生的耐药性状可不受干扰地稳定遗传；第二，MCF-7 细胞中可能存在天然多药耐药系亚克隆细胞。细胞模型的交叉耐药谱分析发现，该模型对博来霉素、表柔比星和米托蒽醌等作用机制与 ADM 类同的药物都可产生较高的交叉耐药；对硫酸长春碱和盖诺等干扰蛋白质合成的药物也可产生一定程度的交叉耐药；对干扰核酸合成的药物，如金属铂类药物的交叉耐受程度则很低。提示本文建立的细胞模型具备 MDR 细胞的基本特征，对临床乳腺癌化疗药的选择有一定的参考价值。

细胞形态学结果显示 MCF-7/MDR^a 细胞和撤药型细胞的分化程度差于同步传代的亲本 MCF-7 细胞, 提示 ADM 低浓度加量持续诱导法有导致 MCF-7 细胞去分化作用的可能。电镜结果也说明 MCF-7/MDR^a、撤药细胞与亲本 MCF-7 形态上差异明显。耐药细胞较亲本 MCF-7 细胞增殖速度和群体倍增时间并没有明显的差异, 表明在产生耐药性后细胞的增殖速度并未受到抑制, 具有明显的耐药细胞性状。撤药培养的 MCF-7/MDR^a 细胞随着撤药时间的延长, 细胞的增殖速度加快, 群体倍增时间缩短, 提示去除药物压力后耐药细胞不但可保留耐药表型, 而且有可能因分化程度降低生长速度加快, 临幊上表现为加速化疗失败后肿瘤患者的病情恶化。耐药细胞生长对营养条件的依赖性降低也从另一角度证明了耐药细胞相对于亲本细胞有明显的生长优势, 如果临幊化疗中出现这种现象将对治疗产生极为不利的影响。

MCF-7/MDR^a 细胞模型的耐药相关标志蛋白 P-gp、LRP 和 GST π 的表达水平较其亲本细胞都有显著增加, 而 MCF-7 细胞的标志性受体 ER 转为阴性表达。虽然细胞模型的耐药相关标志蛋白大幅度增

加, 但在撤药培养 6 天的细胞内仍能检测到大量的 ADM 蓄积。这一现象提示本文建立的 MCF-7/MDR^a 细胞模型的耐药机制可能是由多种因素造成的, 不单是由 MDR1/P-gp 介导的, 进一步的验证尚需采用 RNAi 来解决。总之, 本文根据临幊化疗用药特点成功地建立了具有 MDR 的人乳腺癌耐药细胞模型 MCF-7/MDR^a, 该模型的建立可为研究 ADM 耐药机制、筛选有效的人乳腺癌化疗药物和 MDR 逆转剂提供可靠的实验材料。另外, 实验中发现 MCF-7/MDR^a 细胞的去分化现象, 表现为形态学改变、生长速度加快和细胞生长对营养条件的依赖性降低; 此外, 撤药培养 6 天的细胞中有高浓度的 ADM 蓄积。这两个新现象产生的机制还有待进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Misra S *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 25285
- [2] Gottesman M *et al.* *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**: 48
- [3] Correnti M *et al.* *J Chemother*, 1995, **7**: 449
- [4] 杨纯正. 中华医学杂志, 2001, **81**: 1475
- [5] 李 杰. 上海第二医科大学学报, 2004, **24**: 494
- [6] Batist G *et al.* *J Biol Chem*, 1986, **261**: 15544
- [7] Uchiyama-Kokubu N *et al.* *Anticancer Drugs*, 2001, **12**: 769
- [8] 孙丽媛等. 北华大学学报(自然科学版), 2004, **5**: 122

Establishment of Multidrug-resistant Breast Cancer Cell Line MCF-7/MDR^a and Its Preliminary Analysis on the Biological Properties

Ting Yan, Lian-Fen Zhang, Rong-Rong Zhang¹, Lei Feng, Jian Jin*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;
¹Wuxi No.2 People's Hospital, Wuxi 214002, China)

Abstract In this paper a line of breast cancer cell named MCF-7/MDR^a with multidrug-resistance was established, and its elementary biological properties including drug-resistance, cell cycle dynamics, exterior transformation, and intracellular drug accumulation and so on, were analyzed. Results showed that MCF-7/MDR^a was of good resistance to several chemotherapeutics for tumor. The IC₅₀ of MCF-7/MDR^a to ADM was 500 times higher than that of nature MCF-7, and its IC₅₀ to other chemotherapyagents was 6–75 times higher too. However, the drug resistant index of the cells could keep on over 200 times higher after culturing MCF-7/MDR^a in the medium (without ADM) for 150 days. The multiplication time of MCF-7/MDR^a was similar to that of their nature cells, but the most cells concentrated in S-phase and the least cells in G₁-phase of the cell cycle. The multiplication time could be accelerated in evidence with culturing the cells in the medium (without ADM). The expression levels of P-gp, LRP and GST π on the cells increased significantly except for ER. The level of intracellular ADM concentration of the cells remained high quantity even after 6-day culture in the medium (without ADM). The results indicated that the multidrug-resistant cell species (MCF-7/MDR^a) established in this study was of good biological characteristics, multidrug-resistance especially, which would be helpful to research on MDR mechanism of cancer cells.

Key words breast cancer; cell species MCF-7/MDR^a; adriamycin; multidrug-resistance

Received: November 23, 2005 Accepted: April 10, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-510-85860236, Fax: 86-510-85860236, E-mail: jinjian31@hotmail.com