

文章编号:1005-6947(2007)10-0955-04

· 基础研究 ·

大鼠胰腺癌吉西他滨耐药细胞系 RPC/GEM 的建立

夏维, 田锐, 秦仁义

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 43003)

摘要:目的 建立大鼠胰腺癌吉西他滨(GEM)耐药细胞系 RPC/GEM, 进行生物学特性的研究。方法 采用药物浓度递增法体外反复间歇诱导大鼠胰腺癌 RPC 细胞系 10 个月, 建立多药耐药细胞系 RPC/GEM, 对其光镜形态、生物学特性进行了研究; 同时采用 MTT 法分析其耐药谱; 并用流式细胞术对 RPC/GEM 及其亲代细胞的细胞周期分布的变化进行了分析; 并进行了 RPC/GEM 对抗肿瘤药物的耐药和交叉耐药试验。结果 与亲代细胞相比, RPC/GEM 存在核畸形, 胞浆含有较多颗粒; RPC/GEM 的生长速度相对较慢, 细胞倍增时间为 42.6h, 比亲代细胞系长 8.6h; 细胞周期分布 G_0/G_1 期细胞增多, 为 68.82% \pm 1.42%, G_2/M 细胞为 4.35% \pm 1.71%; MTT 法耐药谱分析表明, RPC/GEM 细胞系对吉西他滨的耐药倍数为 37.1, 对 5-Fu, MTX, CTX 等药物也产生了不同程度的交叉耐药。结论 该实验建立了稳定传代的大鼠胰腺癌多药耐药细胞系 RPC/GEM, 有助于进行胰腺癌的相关基础研究。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(10): 955-958]

关键词: 胰腺肿瘤; 多药耐药; RPC/GEM 细胞系

中图分类号: R 735.9 **文献标识码:** A

Establishment and characterization of a gemcitabine-resistant rat pancreatic cancer cell line RPC/GEM

XIA Wei, TIAN Rui, QIN Ren-yi

(Department of Biliary-Pancreatic Surgery, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To establish a gemcitabine-resistant rat pancreatic cancer cell line RPC/GEM and investigate its biological characteristics. **Methods** A gemcitabine-resistant rat pancreatic cell line was obtained by gradient increase of concentration, and repeated exposure to high doses of gemcitabine for 10 months. The morphological features and growth characters of RPC/GEM were examined. Flow cytometry assay was used to evaluate the cell cycle distribution of both RPC/GEM and its parental cell line RPC. Its sensitivity of drug resistance and cross resistance were observed by MTT assay. **Results** A gemcitabine-resistant rat pancreatic cell line RPC/GEM was succeeded in establishing. Both RPC/GEM and RPC cells were observed by light microscope, that showed there were larger numbers of malformed nuclei in RPC/GEM cells. RPC/GEM cells grew more slowly than RPC cells and their population double time was 7.9 hours, which was longer than RPC cell line. Cell cycle distribution of RPC/GEM cells was changed compared with the parental cells. The percentage of cells in G_0/G_1 phase increased to 68.82% \pm 1.42%, and G_2/M phase decreased to 4.35% \pm 1.71%. The resistance index of RPC/GEM cells to etoposide was 37.1 and the cells showed various cross resistance to 5-Fu, MTX and CTX. **Conclusions** A multidrug resistant rat pancreatic cancer cell line RPC/GEM was established. RPC/GEM cell line was found to possess the basic characteristics of drug resistance and can be used for further experiments.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(10): 955-958]

Key words: Pancreatic Neoplasms; Multidrug Resistance; RPC/GEM Cell Line

CLC number: R 735.9

Document code: A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471693)

收稿日期:2007-06-09; **修订日期:**2007-07-21。

作者简介:夏维,男,湖北武汉人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士,主要从事胆胰肿瘤方面的研究。

通讯作者:夏维 E-mail:jamesxia@163.com

胰腺癌常常确诊时已经属于晚期,切除率和治愈率较低,5年生存率亦低^[1],因此抗肿瘤药物的作用在治疗中就相当重要。然而,胰腺癌普遍对抗肿瘤药物不敏感,很容易发生多药耐药(multidrug-resistance, MDR)现象,导致抗肿瘤治疗失败。吉西他滨(gemcitabine, GEM),是一种新型脱氧胞苷类似物,属于嘧啶类抗代谢类药物,已经被广泛应用于胰腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、乳腺癌及其他实体肿瘤的临床治疗^[2-3]。本实验通过模拟临床用药特点,采用体外反复药物诱导的方式,建立了大鼠胰腺癌吉西他滨耐药细胞系RPC/GEM,并对其生物学特性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大鼠胰腺癌RPC细胞系由本实验室(同济医学院胆胰外科实验室)原代培养^[4],RPMI-1640培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司;抗肿瘤药物:吉西他滨(GEM,美国礼来公司),5-氟脲嘧啶(5-FU,天津金耀氨基酸有限公司),甲氨喋呤(MTX,北京医科大学实验药厂),环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司)。

1.2 细胞培养

大鼠胰腺癌RPC细胞系由本实验室原代培养,稳定传代并反复冻存后,生物特性稳定。本实验采用第80代RPC细胞作为亲代细胞,在RPMI-1640培养液(内含10%胎牛血清、青霉素100U/mL链霉素100 μ g/mL)中培养,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂环境下培养。每日观察细胞生长情况。

1.3 耐药细胞株的诱导

采用大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方法诱导。根据预实验结果,取对数生长期RPC细胞与IC50浓度(4.78 μ g/mL)的吉西他滨(以培养液稀释,使用前临时配制)在培养箱内共同培养24h后,弃含药培养液。此时,大部分细胞死亡,存活细胞缓慢生长,更换普通培养液继续培养,待存活细胞长满培养瓶,进入对数生长期后,使用2倍于上述浓度的吉西他滨继续培养,如此反复换液、传代,并不断提高吉西他滨药物浓度,每4周检测其耐药性,直至其对高浓度的吉西他滨产生稳定耐药性,并且在无药培养液中以及反复冻存后耐药性依然保持稳定,整个过程持续10个月。

1.4 耐药谱分析(MTT法)

取对数生长期的大鼠胰腺癌RPC细胞及对吉西他滨耐药的RPC/GEM细胞,0.1%的胰酶和0.25%的EDTA消化后,以1 \times 10⁵/mL的浓度接种于96孔培养板,每孔200 μ L,培养24h后加入

生理盐水稀释的不同浓度的各种抗肿瘤药物,每种药物浓度设置6个复孔,共同作用24h后,每孔加入20 μ L MTT溶液(5mg/mL),继续培养4h后,离心去除培养液,每孔加入150 μ L二甲基亚砜(DMSO),用震荡器震荡10min溶解结晶,在全自动酶标仪上选择波长570nm测定吸光值,比色时空白孔调零,全部实验重复3次,取平均值。根据吸光值计算RPC细胞存活率,计算公式为:细胞存活率(%) = 用药组吸光值/对照组吸光值 \times 100%。根据各药物存活率,由药物浓度的对数值与细胞存活率线性回归求出各药物的半数抑制率(IC50)。耐药倍数计算方法是,耐药倍数 = IC50(子代RPC/GEM)/IC50(亲代RPC)。

1.5 细胞生物学特性检测

1.5.1 光镜检查 经HE染色后观察活细胞的形态结构。

1.5.2 生长曲线 将对数生长期的细胞,以1 \times 10⁵/mL传代,于24,48,72,96,120h计算细胞数,绘制细胞生长曲线,计算倍增时间。按Patterson公式计算细胞在对数生长期的群体倍增时间(Td) = T₁G₂/lg(N/N₀)(T代表细胞处于对数生长期的培养时间,N及N₀分别代表对数生长期的起始和终止的细胞数);

1.5.3 克隆形成率的检测 取对数生长期的RPC和RPC/GEM细胞,按每个平皿400个细胞的浓度加入直径35mm的平皿中,镜下见细胞散在分布均匀,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂环境下培养,于第14天取出后观察,细胞已形成细胞克隆,弃培养液,常规固定、姬姆萨染色,计数>50个细胞的克隆数。克隆形成率(%) = 克隆形成数/接种细胞数 \times 100%;

1.5.4 细胞周期测定 将处于对数生长期的RPC及RPC/GEM细胞经0.1%的胰酶和0.25%的EDTA消化后,1 \times 10³rpm离心并用冷PBS洗2次,预冷4 $^{\circ}$ C的70%乙醇固定细胞。上机测定前离心去乙醇,用PBS洗涤2次,加100 μ g/mL RNase 37 $^{\circ}$ C消化30min。碘化丙啶(propidium iodide, PI)50 μ g/mL闭光染色30min,通过流式细胞仪测定。实验结果经计算机软件ModFit L T2.0处理,计算出细胞周期的分布。

1.6 统计学处理

利用SPSS软件,对数据采用构成比的 χ^2 检验进行统计分析。

2 结 果

2.1 RPC/GEM大鼠胰腺癌耐药细胞株的诱导和建立

经过61次传代建立成功RPC/GEM耐药细胞

系。RPC 对吉西他滨的 IC₅₀ 为 4.78 μg/ mL, RPC/GEM 对 RPC 的 IC₅₀ 为 177.5 μg/ mL, 耐药倍数为 37.1 倍。将 RPC/GEM 在不含药物的普通培养液中培养 4 周到 8 周后,其依然保持原有耐药性。

2.2 形态学观察

光镜下, RPC/GEM 细胞与 RPC 细胞形态结构存在较大差异。RPC 细胞最初在经过吉西他滨药

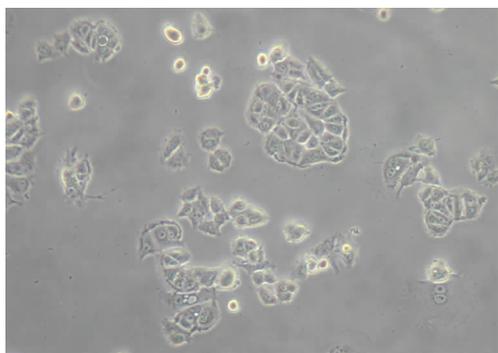


图 1 GEM 诱导初期 RPC 细胞形态 在倒置相差显微镜下大多数 RPC 细胞死亡,存活的少数细胞失去正常形态

物作用 24h 后,在倒置相差显微镜下细胞呈现出较大形态改变,首先是细胞核逐渐崩解,进而出现细胞膜破裂,大多数细胞基本失去正常形态(图 1)。经过长时间诱导后, RPC/GEM 耐药细胞的外形多呈圆形或卵圆形,但是细胞大小不一,偶见有巨大多核细胞,细胞核大形态不规则,畸形核多见,核膜凹陷明显,染色质分布不均,有的凝集成块,胞浆内有较丰富的颗粒(图 2)。

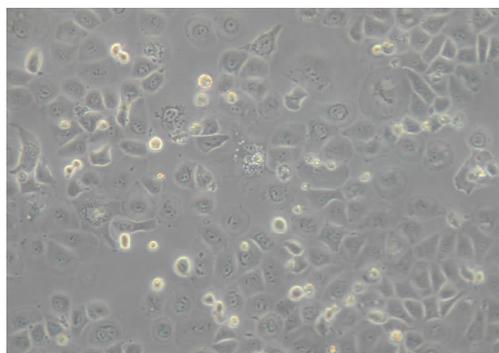


图 2 GEM 长期诱导 RPC 细胞形态 长期诱导后的 RPC/GEM 细胞可以在含有高浓度吉西他滨的培养基中存活,大多数细胞形态正常,胞浆清亮,可见巨型多核细胞和较多核分裂像

2.3 RPC/GEM 细胞交叉耐药性分析

经过诱导后, RPC/GEM 细胞不仅对吉西他滨的耐药性增加 37.1 倍,而且对另外 3 种临床常用的抗肿瘤药物 5-FU、MTX 和 CTX 产生了不同程度的耐药,耐药倍数分别 21.7, 8.6, 3.3。

2.4 RPC/GEM 细胞生长特征

RPC/GEM 及 RPC 在普通培养液及含 IC₅₀ 浓度吉西他滨的培养液中的生长曲线不同。在普通培养液中, RPC/GEM 生长减慢,细胞的指数增殖期为 2 ~ 6d, RPC 细胞的倍增时间为 34h, RPC/GEM 的群体倍增时间为 42.6h, 增加 8.6h。

RPC/GEM 及 RPC 细胞的克隆形成率分别为 82% 及 87% ($P > 0.05$)。在含药培养液中, RPC/GEM 的倍增时间为 51.5h, 而 RPC 细胞不能生长, 72h 后细胞几乎全部死亡。流式细胞仪分析细胞周期可见, 耐药细胞系较亲代细胞的细胞周期分布发生明显改变, 其中 G₀/G₁ 期细胞从亲代细胞的 80.59% 减少到 69.60% ($P < 0.01$), G₂/M 期细胞则从亲代的 3.95% 增加到 8.97% ($P < 0.01$), S 期细胞也从 15.45% 增加到 21.43% ($P < 0.01$) (图 3-4)。

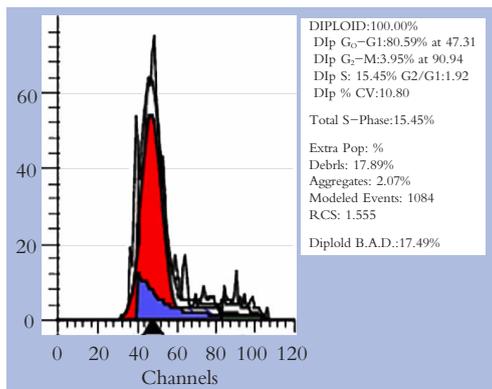


图 3 流式细胞仪检测亲代 RPC 细胞的细胞周期

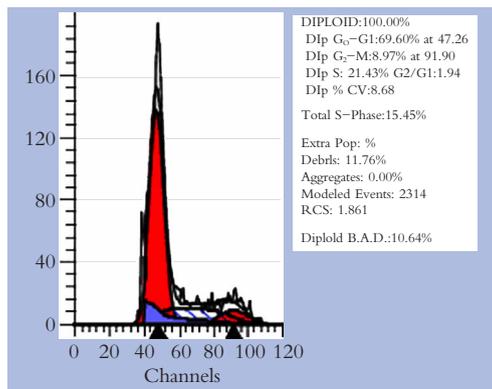


图 4 流式细胞仪检测子代 RPC/GEM 细胞的细胞周期

3 讨论

吉西他滨,商品名为健择(gemzar),化学名为2'-脱氧-2'2'-盐酸双氟脱氧胞苷,分子式C₉H₁₂C₁F₂N₃O₄,分子量299.66。吉西他滨的是一种前体药物,其作用机制是在细胞内转化为吉西他滨磷酸化合物,抑制核糖核苷酸还原酶,从而抑制DNA所需要的dCTP的合成。同时,吉西他滨三磷酸(dFdCTP)具有竞争性抑制内源性dCTP进入DNA链的作用,导致DNA片段的复制中止和断裂,使细胞进入程序性死亡^[5]。在体外实验中,吉西他滨显示出了对多种肿瘤细胞株的细胞毒性作用。在动物模型中,也表现出广谱抗肿瘤活性。本实验结果显示,吉西他滨对原代培养后建立的大鼠胰腺癌细胞系RPC也同样具有毒性作用,且随着剂量和作用时间的增加,RPC细胞系开始对吉西他滨产生获得性耐药,并且对5-FU,MTX,CTX等其他抗肿瘤药物亦可产生交叉耐药。

在细胞的生长特点方面,本实验结果表明,耐药细胞系RPC/GEM的生长减慢,细胞倍增时间比亲代细胞系长8.6h。且RPC/GEM的生长特点与其细胞增殖周期的变化有关,即G₀/G₁期细胞减少,S期和G₂/M细胞较亲代细胞增加,说明处于有丝分裂期的细胞减少,而处于静止期的细胞增多。吉西他滨作用胰腺癌细胞后细胞周期研究的结果显示,更多细胞被阻止在S期,这有利于其他抗肿瘤药物的协同作用,在国内外的研究也能得到相似结论^[6-7]。同时这种耐药性和胰腺癌细胞bcl-xL和mcl-1表达水平上调相关^[8]。

在本实验中对不同抗癌药物的敏感性分析中可以看出,RPC/GEM对吉西他滨产生了持续的耐药性。经过10个月的诱导,RPC/GEM能够在含有177.5μg/mL吉西他滨的培养基中长期存活。在交叉耐药试验中,RPC/GEM不仅对吉西他滨产生耐药,对3种临床常用的抗肿瘤药物5-FU,MTX,CTX产生了不同程度的耐药^[9]。因为,肿瘤细胞与抗癌药物接触后,不仅对所接触的药物产生耐药性,还会对结构和功能不同的其他药物也产生交叉耐药性。通常认为,细胞产生耐药和交叉耐药的机制是细胞排出药物的能力增加,并于

MDR1基因编码的P-GP蛋白过度表达相关。由于抗肿瘤药物可以诱导肿瘤细胞产生多药耐药,故可以解释为何在临床和实验研究中,多药联合化疗同样无法有效的杀伤肿瘤细胞^[10-11]。

RPC/GEM的建立对在细胞和分子水平研究胰腺癌的多药耐药机制具有一定的实用价值,同样也为抗肿瘤药物的作用和耐药逆转等课题提供了必要的实验材料。

参考文献:

- [1] Michael G. Molecular Markers of Early Pancreatic Cancer [J]. *J Clin Onco*, 2005, 23(20): 4524 - 4531.
- [2] Philippe P, Christopher G, Glenda Kohlhagen, *et al.* Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an Antimetabolite That Poisons Topoisomerase I [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 2499 - 2504.
- [3] 黄洁,田大广,张捷,等. 吉西他滨区域性动脉灌注联合全身化疗治疗晚期胰腺癌[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(5): 471 - 473.
- [4] 夏维,秦仁义. 大鼠胰腺癌细胞系R-PC的建立及其生物学特性[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(6): 692 - 694.
- [5] Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, *et al.* Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine) [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(14): 4417 - 4422.
- [6] Baron BM. Gemcitabine: a pharmacologic and clinical overview [J]. *Cancer*, 1999, 22(2): 176 - 183.
- [7] 郭俊超,赵玉沛,廖泉,等. 胰腺癌耐药细胞株SW1990/FU的建立、鉴定及生物学特性[J]. *中国医学科学院报*, 2005, 27(5): 592 - 596.
- [8] Shi Xin, Gao Nai-rong, Huo Ming-dong, *et al.* The expression of bcl-xl and mcl-1 following acquired chemoresistance in pancreatic cancer cells [J]. *Chin J Curr Adv Gen Sur*, 2002, 5(3): 156 - 161.
- [9] Klein B, Sadikov E, Mishaeli M, *et al.* Comparison of 5-FU and leucovorin to gemcitabine in the treatment of pancreatic cancer [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(4): 875 - 877.
- [10] 杜志勇,陈立模,秦仁义. 氟尿嘧啶与生长抑素受体基因联合治疗鼠胰腺癌移植瘤的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(11): 826 - 830.
- [11] Bellone G, Carbone A, Busso V, *et al.* Antagonistic interactions between gemcitabine and 5-fluorouracil in the human pancreatic carcinoma cell line Capan-2 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(10): 1294 - 1303.