

文章编号:1005-6947(2005)03-0186-04

· 实验研究 ·

人结肠癌耐药细胞系 SW480/ADM 的建立及其生物学特性

黄柏英, 祝和成, 顾焕华

(中南大学湘雅医学院 细胞生物学研究室, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 建立人结肠癌 SW480 耐阿霉素细胞系(SW480/ADM), 研究其耐药机制及逆转。方法 应用人结肠癌细胞系 SW480, 以递增阿霉素(ADM)浓度的方法, 体外连续培养建成一株 SW480/ADM。观察该细胞生长规律。用 MTT 比色法检测该耐药细胞系的多药耐药性; 以流式细胞术检测该耐药细胞的细胞周期分布、细胞表面多药耐药基因(MDR)的表达产物 P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP)及谷胱甘肽硫转移系统(GSH/GST)的表达; 用高效液相色谱仪检测耐药细胞内阿霉素含量。结果 SW480/ADM 细胞与 SW480 细胞相比, 生长缓慢, 倍增时间延长, 细胞周期分布发生改变; SW480/ADM 细胞较 SW480 的阿霉素半数抑制浓度(IC₅₀)增大 13.22 倍, 并对多种抗癌药物产生耐药性。SW480/ADM 细胞表面 MDR 的表达产物 P-gp, MRP 和 GSH/GST 的表达均较 SW480 细胞显著升高($P < 0.01$)。SW480/ADM 细胞内阿霉素含量明显低于 SW480 细胞。结论 SW480/ADM 细胞对阿霉素的耐药是获得性的, 并呈多药耐药性特征, 可用于对人结肠癌耐药、逆转和 MDR 机制等方面的研究。

关键词: 结肠肿瘤; 肿瘤细胞, 培养的; 药物筛选试验, 抗肿瘤

中图分类号: R735.35; R73-351

文献标识码: A

Establishment of human colon carcinoma multidrug-resistant SW480/ADM cell line and study of its biological characteristics

HUANG Bai-ying, ZHU He-cheng, GU Huan-hua

(Department of Cell Biology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To establish an adriamycin resistant human colon cancer cell line SW480 (SW480/ADM), and study their drug resistance mechanism and reversal. **Methods** An ADM-resistant human colon carcinoma cell line SW480/ADM was induced by continuously exposing human colon carcinoma cell line SW480 to gradually increasing doses of Adriamycin (ADM). The multidrug resistance of SW480/ADM was evaluated by MTT assay. The distribution of its cell cycle, the expressions of P-gp, multidrug resistance-associated protein (MRP) and GSH/GST were detected by flow cytometry. ADM content in the SW480/ADM was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results** Compared with parental cell line SW480, the SW480/ADM cell line had a slower growth rate and longer doubling time, and distribution of its cell cycle had changed. SW480/ADM was resistant to many anti-tumor agents. IC₅₀ of ADM of SW480/ADM cells was 13.22 times higher than that of parental cell line SW480, and the expressions of P-gp, MRP and GSH/GST were enhanced significantly ($P < 0.01$). ADM content of the SW480/ADM cells was markedly lower than that of SW480 cells. **Conclusions** The resistance of SW480/ADM cells to ADM was acquired and had the characteristic of multidrug resistance, and can be used for the study of drug-resistance, reversal and MDR mechanism of human colon carcinoma.

Key words: COLON NEOPLASMS; TUMOR CELLS, CULTURED; DRUG SCREENING ASSAYS, ANTITUMOR

CLC number: R735.35; R73-351

Document code: A

收稿日期:2004-11-15; 修订日期:2005-01-21。

作者简介:黄柏英(1965-),女,湖南临武人,中南大学湘雅医学院实验师,主要从事细胞生物学方面的研究。

通讯作者:黄柏英 电话:0731-4805382(O),13974903888(手机); E-mail:huangby999@yahoo.com.cn。

阿霉素 (adriamycin, ADM) 是一种蒽环类抗癌抗生素,用于治疗多种恶性肿瘤,但肿瘤细胞易对其产生耐药性,是化疗失败的重要原因之一^[1~3],也是一个有待解决的难题。耐药细胞系的建立是探讨癌症化疗、耐药、逆转及其耐药机制的基础。本室采用逐渐增加 ADM 浓度的方法,体外连续培养建成一株人结肠癌 SW480 耐阿霉素细胞系,命名为 SW480/ADM,同时研究其生物学特性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SW480 人结肠癌细胞系引自美国典型培养物保藏中心(ATCC),由本室提供。另备 RPMI1640 培养基(Gibco),新生小牛血清(杭州四季青),阿霉素(ADM,意大利爱宝大药厂),丝裂霉素(MMC,浙江海正药业股份有限公司),长春新碱(VCR,广州明兴制药有限公司),5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司),环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司),MTT(Sigma),MRK16,MRP1, GSH/GST 鼠抗人单克隆抗体和鼠抗人 isotype-matched 单克隆抗体(法国国际免疫技术有限公司),羊抗鼠荧光标记抗体(华美生物工程公司)。

1.2 方 法

1.2.1 SW480/ADM 耐药细胞系的建立 SW480 细胞培养于 RPMI1640 培养液(含 10% 小牛血清和 100 U/mL 的青霉素、100 μg/mL 的链霉素),置 37℃,5% CO₂ 条件下培养,细胞呈单层贴壁生长。采用药物浓度持续接触递增诱导的方法^[4],阿霉素 0.01 μg/mL 开始,逐渐增加剂量,最终使 SW480 细胞持续生存于阿霉素 2.0 μg/mL 的培养环境中,并连续传代培养,共传代 100 多次。每 2~3 周检测其耐药性,30 周建成 SW480/ADM 耐药细胞系,在无 ADM 培养液中培养 18 周后,SW480/ADM 细胞的耐药性稳定。以下所有实验均在撤药 2 周后的 1 周内完成。

1.2.2 生长曲线测定 按文献^[5]将生长旺盛的 SW480 及 SW480/ADM 细胞制成 2×10^4 个/mL 的单细胞悬液接种于 24 孔板中,共接种 2 块 24 孔板,1 mL/孔。每天每块计数 3 孔,连续计数 8 d,绘制生长曲线。按 Patterson 公式计算细胞在对数生长期的倍增时间: $T_d = T_l g 2 / \lg(N_t / N_0)$ T_d 为倍增时间(h) T 为细胞数由 N_0 增至 N_t 所用时间; N 为细

胞数。

1.2.3 流式细胞仪测定细胞周期分布 取对数生长期的 SW480 和 SW480/ADM 细胞,经胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,离心,去上清,用 PBS 缓冲液洗 2 次,加 70% 乙醇固定 4℃ 贮存。测前离心去上清液,加入 PI 染液冰浴 30 min,用美国 Coulter 公司 EPICS XL 型流式细胞仪分析细胞周期。

1.2.4 MTT 法药敏试验 采用 MTT 法分别检测 SW480 和 SW480/ADM 细胞对药物的敏感性。取对数生长期的 SW480 和 SW480/ADM 细胞经酶消化制成单细胞悬液,细胞密度为 8×10^5 个/mL,接种于 96 孔板中;每孔 180 μL,共接种 3 块 96 孔板,培养 24 h 后参照抗癌药物血浆高峰浓度每孔加入不同浓度的上述药物^[5] 20 μL,每种药物浓度设 5 个复孔,培养 48 h;然后加入 20 μL/孔 MTT 5 mg/mL,继续培养 4 h;倒出每孔培养液,加入 DMSO 200 μL 溶解蓝色结晶,经微型混合振荡器振荡 10 min,用酶标仪于 570 处测定各孔光吸收值(OD 值),计算细胞存活率[存活率 = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%]。以药物浓度为横轴,存活率为纵轴绘制浓度效应曲线,确定半数抑制浓度(IC₅₀)。计算耐药指数(IR) = 耐药细胞 IC₅₀/亲本细胞 IC₅₀。

1.2.5 细胞内阿霉素聚积量的测定 采用高效液相色谱法(HPLC),将 SW480 和 SW480/ADM 细胞接种于 T₁₀₀ 培养瓶中,每瓶接种 5×10^5 个细胞,共接种 10 瓶,培养 24 h,用 PBS 冲洗 3 次,制成单细胞悬液;离心,去上清,加入蒸馏水 1 mL,反复冻融使细胞破裂,混匀,用高速离心机离心 30 min,上清液在高效液相色谱仪上测 ADM 的荧光强度。

1.2.6 流式细胞仪测定 P-gp, MRP 及 GSH/GST 的表达 取 SW480 和 SW480/ADM 细胞(2×10^5 个/mL)分 4 组,每组 5 管,分别加入 MRK16(对 MDR1)、MRP1(对 MRP)、GSH/GST 鼠抗人单克隆抗体,以鼠抗人 isotype-matched 单克隆抗体作对照,4℃ 孵育 1 h,分别加入羊抗鼠荧光标记抗体 4℃ 孵育 30 min,上流式细胞仪测定荧光强度。

1.3 统计学处理

数据处理用 t 检验。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 SW480 和 SW480/ADM 细胞的生物学特性

SW480 细胞和 SW480/ADM 细胞在倒置显微镜下形态结构相似,呈上皮形,大小不一致。以递增 ADM 浓度体外连续培养 30 周后,SW480/ADM 细胞在含 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的完全 1640 培养液中生长良好,其对 ADM 耐药性(IC_{50})为亲代 SW480 细胞的 13.22 倍,无 ADM 培养 18 周后耐药性仍稳定。

SW480 和 SW480/ADM 细胞的倍增时间分别为 24.8 h 和 43.2 h,后者明显延长;耐药细胞倍增时间较其亲代增加 18.4 h,SW480/ADM 细胞对数生长期增殖速度减慢。测耐药及亲代细胞周期分布见表 1,SW480/ADM 细胞与亲代细胞相比,SW480/ADM 细胞 G_1 期增多而 S 期、 G_2 期减少。

表 1 SW480/ADM 细胞系基本特征($\bar{x} \pm s$)

细胞系	ADM(IC_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$)	倍增时间(h)	细胞周期分布(%)		
			G_1	S	G_2
SW480	25.34 \pm 0.012	24.8	55.8 \pm 0.8	34.8 \pm 1.0	9.6 \pm 0.26
SW480/ADM	335.20 \pm 0.005	43.2	61.6 \pm 1.9	32.4 \pm 1.3	5.4 \pm 0.5

2.2 SW480 细胞和 SW480/ADM 细胞的药物敏感性

SW480/ADM 细胞不仅对 ADM 耐药,而且对另外 4 种常用化疗药物也具有不同程度的耐药性(表 2)。

表 2 SW480、SW480/ADM 细胞的敏感性($\bar{x} \pm s$)

药物	半数抑制浓度 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		耐药指数
	SW480 细胞	SW480/ADM 细胞	
阿霉素(ADM)	25.34 \pm 0.012	335.20 \pm 0.005	13.22
长春新碱(VCR)	20.06 \pm 0.003	45.84 \pm 0.005	2.29
丝裂霉素(MMC)	10.01 \pm 0.014	23.33 \pm 0.026	2.33
环磷酰胺(CTX)	116.67 \pm 0.009	425.50 \pm 0.003	3.64
5-氟尿嘧啶(5-FU)	216.66 \pm 0.015	250.60 \pm 0.003	1.16

2.3 细胞内阿霉素药物聚积量

SW480 细胞和 SW480/ADM 细胞分别与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADM 培养 24 h 后,SW480 细胞内的 ADM 含量为(0.370 \pm 0.041) $\mu\text{g}/\text{mL}$,耐药细胞中 ADM 含量为(0.099 \pm 0.003) $\mu\text{g}/\text{mL}$;两者差异有显著性($t = 14.74$, $P < 0.01$)。

2.4 P-gp, MRP 和 GSH/GST 表达的变化

SW480/ADM 细胞的 P-gp, MRP 在膜上表达和 GSH/GST 的表达较 SW480 细胞显著提高(表 3)。

表 3 流式细胞分析 P-gp, MRP 和 GSH/GST 荧光细胞染色率($\bar{x} \pm s$)

细胞	荧光细胞染色率(%)								
	P-gp	t	P	MRP	t	P	GSH/GST	t	P
SW480	23.4 \pm 0.04			34.6 \pm 0.06			29.6 \pm 0.06		
SW480/ADM	80.5 \pm 2.45	47.55	<0.01	75.3 \pm 3.24	28.08	<0.01	30.2 \pm 0.12	12.01	<0.01

3 讨论

自从 1970 年 Biedler 和 Riehm^[7] 报道中国仓鼠肺细胞(CHL 细胞)和 P388 细胞对抗肿瘤药物交叉耐药以来,国内外已建立了各种耐药肿瘤细胞系,并对肿瘤细胞耐药的特点、耐药细胞的生化改变、耐药基因的研究和克服耐药措施等方面进行了一系列研究,也取得了一定的进展。本室应用

ADM 诱导人结肠癌 SW480 细胞系,体外连续传代培养 30 周,建立了表现为 MDR 特征的耐 ADM 的 SW480/ADM 细胞系。该耐药细胞系在 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 ADM 培养液中生长良好,无 ADM 培养 18 周后,其耐药性稳定。

应用 ADM 在体外诱导癌细胞产生抗药性,已成为肿瘤抗药性研究的主要途径。肿瘤细胞对一

种抗癌药物耐受时,对其他结构或药理不同的药物亦可产生耐药性,称为多药耐药性(MDR)。导致肿瘤细胞产生多药耐药性的原因主要与 P-gp, MRP 和 GSH/GST 的高表达、DNA 拓扑异构酶 II 活性的改变^[8-11]有关。SW480/ADM 细胞系对阿霉素的耐药指数为 13.22,表明该耐药细胞系对阿霉素的耐受性比 SW480 提高了 13.22 倍,该细胞系除对 ADM 耐药外,还对 VCR, MMC, CTX 和 5-Fu 不同程度的耐药。同时 SW480/ADM 细胞系的 *mdr1* 基因表达产物 P-糖蛋白在膜上表达较 SW480 细胞显著提高 ($P < 0.01$),并且 SW480/ADM 细胞 MRP 表达阳性率高于 SW480 细胞。这可能是 SW480/ADM 细胞内药物蓄积减少,构成耐药性的分子基础。SW480/ADM 细胞内 GSH 的活性与 SW480 细胞相比 GSH/GST 的表达有明显差异 ($P < 0.01$),说明 GSH 的活性改变有可能与 SW480/ADM 耐药性有关。

SW480/ADM 耐药细胞系为国内首次建成的人结肠癌耐 ADM 的细胞系。对其初步研究结果显示,其耐药性与该细胞表面 P-gp, MRP 和 GSH/GST 高表达有关。该耐药细胞系可望作为体外筛选抗肿瘤性逆转剂,并为进一步研究人结肠癌 ADM 耐药及逆转机制提供了实验材料。

参考文献:

[1] Ling V. P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs [J]. *Cancer*, 1992, 69(10): 2603-2609.

- [2] Curt GA, Cendeninn NJ, Chabner BA. Drugs resistance in cancer [J]. *Cancer Treat Rep*, 1984, 68(1): 86-99.
- [3] 曾庆华,吕新生,汤恢焕. MTT 测定恶性肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 [J]. *中国普通外科杂志*, 2000, 9(6): 552-554.
- [4] Yang LY, Trujillo JM. Biological characterization of multidrug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(11): 3218-3225.
- [5] 司徒镇强,吴军. 细胞培养 [M]. 西安:世界图书出版公司,1996. 175-182.
- [6] 章静波. 组织和细胞培养技术 [M]. 北京:人民卫生出版社,2002. 149-150.
- [7] Biedier JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: Cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies [J]. *Cancer Res*, 1970, 30(9): 1174.
- [8] 张辉,张有成,王彬,等. 结直肠癌中 MEK2/ERK 信号传导通路的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(4): 257-260.
- [9] Endo K, Maehava Y, Ichiyoshi Y, et al. Multidrug resistance-associated protein expression in clinical gastric carcinoma [J]. *Cancer*, 1996, 77(8 Suppl): 1681-1685.
- [10] Zwelling LA, Mayes J, Deisseroth K, et al. A restriction fragment length polymorphism for human topoisomerase II: possible relationship to drug-resistance [J]. *Cancer Commu*, 1990, 2(11): 357-361.
- [11] Waxman DJ, Glutathione S-transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy review [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(20): 6449-6454.

本刊 2005 年下半年各期重点内容安排

本刊 2005 年下半年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第 7 期	胆道外科	第 10 期	肝脏外科、血管外科
第 8 期	甲状腺外科、乳腺外科	第 11 期	胰腺外科
第 9 期	胃肠道肿瘤	第 12 期	内镜及腔镜外科