

鼻咽癌顺铂耐药细胞系的建立及其耐药性变化

唐三元¹, 黄卫国², 朱媛¹, 苏菊¹, 陈琳¹, 殷未兰¹, 李跃华¹

(1. 南华大学附属第一医院肿瘤内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所)

摘要: **目的** 通过顺铂(cDDP)浓度递增法建立鼻咽癌耐药的细胞株 CNE2/cDDP, 并研究其耐药性变化。**方法** 采用 cDDP 浓度递增法建立鼻咽癌顺铂耐药细胞系 CNE2/cDDP, 倒置显微镜进行形态学观察, MTT 检测 CNE2/cDDP 细胞系对不同化疗药物的耐药性。**结果** MTT 研究发现在不同药物(顺铂、长春新碱、卡铂、紫杉醇、5-FU)作用下, CNE2/cDDP 较 CNE2 的 IC_{50} 值及耐药指数均有明显的增加, CNE2/cDDP 细胞对顺铂的耐药性最强, 增加到 200.6 倍, 对 5-Fu 的耐药性最差, 增加到 2.8 倍; 耐药细胞株 CNE2/cDDP 较非耐药细胞株 CNE2 生长速度减慢, 其细胞倍增时间由 18 h 增加到 24 h; CNE2/cDDP 细胞体积较 CNE2 为小, 常呈克隆聚集现象。**结论** CNE2/cDDP 具有多药耐药性, 是一个理想的用于鼻咽癌的多药耐药研究的细胞系。

关键词: 顺铂; 鼻咽癌; 多药耐药性; 细胞系(CNE2/cDDP)

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A

Establishment of cis-Diammine-Dichloro-Platinum (cDDP)-resistant NPC Cell Lines (CNE2/cDDP) and Study of the Changes of Drug Resistance

TANG Sanyuan, HUANG Weiguo, ZHU Yuan, et al

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the changes of drug resistance of NPC by establishing the cis-Diammine-Dichloro-Platinum (cDDP)-resistant NPC cell lines (CNE2/cDDP) through cDDP concentration progressively increased method. **Methods** CNE2/cDDP was established by cDDP concentration progressively increased method. Morphology study was performed by invert microscope, and drug resistance to cDDP, Vincristin, Carboplatin, Taxotere, and 5-fluorouracil were detected by MTT. **Results** MTT showed that there was significant increase of IC_{50} and resistance index in CNE2/cDDP compared to CNE2, after dealt with cDDP, Vincristin, Carboplatin, Taxotere, and 5-fluorouracil. And the drug resistance of cDDP in CNE2/cDDP was the highest, and RI (resistance index) was increased to 200.6-folds compared to CNE2. While the lowest drug resistance was in 5-Fu, and RI was increased to 2.8-folds compared to CNE2. There were clone aggregation and slow growth speed in CNE2/cDDP and more longer doubling time increased from 18 h in CNE2/cDDP to 24 h in CNE2. And there were much smaller volume in CNE2/cDDP compared with CNE2. **Conclusion** CNE2/cDDP may serve as an ideal cell line used for study of drug resistance in NPC for its multi-drug resistance.

Key words: cDDP; NPC; multi-drug resistance; cell lines(CNE2/cDDP)

肿瘤细胞的多药耐药性(multidrug resistance, MDR),是指恶性肿瘤细胞在接触一种抗癌药后,产

生了对其他抗癌药的耐药性^[1],MDR是恶性肿瘤化疗失败和临床复发的主要原因。鼻咽癌是中国南方最常见的恶性肿瘤之一,临床上鼻咽癌的发病比较隐蔽,难以早期发现,就诊时大部分患者已是鼻咽癌晚期^[2]。鼻咽癌临床上单纯采用化疗效果较差,容易产生耐药性^[3]。为进一步研究鼻咽癌耐药性产生的原因,本研究通过浓度递增法建立了鼻咽癌的

收稿日期:2013-05-27

基金项目:国家自然科学基金(81172210),湖南省自然科学基金衡阳联合基金(10JJ9017)。

作者简介:唐三元,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤的化学治疗,E-mail:tsy09@126.com。

顺铂耐药细胞系,并研究其耐药性变化。

1 材料与方法

1.1 材料

低分化鼻咽癌细胞系 CNE2 购自中南大学细胞室。CNE2 细胞株及耐药细胞株 CNE2/cDDP 均用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基进行常规传代培养。

1.2 浓度递增法建立鼻咽癌耐药细胞株 CNE2/cDDP

在无菌生理盐水中,加入临床用顺铂针剂,将顺铂加入培养基中,按照初始浓度为 $0.05 \mu\text{g/mL}$,逐步将浓度增加到 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 、 2.0 、 4.0 、 $8.0 \mu\text{g/mL}$,总共 10 个浓度梯度,直至细胞不能耐受为止。经过 2 周观察和实验,发现 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 为 CNE2 细胞的极限耐受浓度,细胞生长尚可,经 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 筛选 2 周后,得到了鼻咽癌耐药细胞株 CNE2/cDDP,可进行下一步研究。实验前先用不含 cDDP 或其他药物的培养基培养 3 天。

1.3 MTT 检测 IC_{50} 值

选取对数生长期细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,加入 96 孔板,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。再分别加入 $100 \mu\text{L}$ 含 10 倍药物浓度梯度的培养基,5 种药物分别为顺铂(cDDP)、长春新碱(vincristin)、卡铂(carboplatin)、紫杉醇(taxotere)、5-FU(5-fluorouracil)。每孔总体积 $200 \mu\text{L}$,每个药物共设 7 个浓度梯度和 1 个空白对照,各种药物的每个稀释度做 3 个平行孔。细胞培养 48 ~ 72 h 后,每孔加入 10 mg/mL 的 MTT $15 \mu\text{L}$,继续培养 4 h,吸出上清培养基,每孔再加入 DMSO $200 \mu\text{L}$,轻微振荡溶解结晶。以 570 nm 波长进行检测,在酶标仪上检测各孔的吸光度(OD 值)。

1.4 耐药指数计数

以 origin pro 8.0 软件进行数据分析,首先计算各个药物不同浓度的抑制率 $= 1 - (\text{OD}_{\text{试验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}})$,以此 OD 值代表细胞数目,以浓度为 X 轴,以抑制率为 Y 轴绘制抑制曲线,通过计算得到各个药物的 IC_{50} 值。耐药指数 $= \text{IC}_{50\text{实验组}} / \text{IC}_{50\text{对照组}}$ 。

1.5 细胞生长曲线和倍增时间测定

取对数生长期的不同细胞, 0.1% 胰酶消化,制成单细胞悬液,以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 密度常规培养于 24 孔板中,每孔中培养基为 1 mL 。每日取其中的 3 孔用

胰酶消化后进行细胞计数。连续观察及计数 7 天,以培养日期为 X 轴,细胞数目为 Y 轴,绘制细胞的生长曲线。

以常用的 Patterson 公式计算细胞在对数生长期的倍增时间: $\text{DT} = t * [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$ 计算。 t 为培养时间, N_0 为首次记下的细胞数, N_t 为 t 时间后的细胞数,一般 N_0 在接种细胞 24 h 后进行。细胞的形态学观察倒置显微镜观察非耐药细胞株 CNE2 和耐药细胞株 CNE2/cDDP 的形态并拍照。

1.6 统计学分析

统计分析通过 SPSS17.0 软件进行分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 两种细胞的生长曲线

通过绘制非耐药细胞株 CNE2 和耐药细胞株 CNE2/cDDP 的生长曲线,发现耐药细胞株 CNE2/cDDP 较非耐药细胞株 CNE2 生长速度减慢 ($P < 0.05$),其细胞倍增时间由 18 h 增加到 24 h ($P < 0.05$) (图 1)。

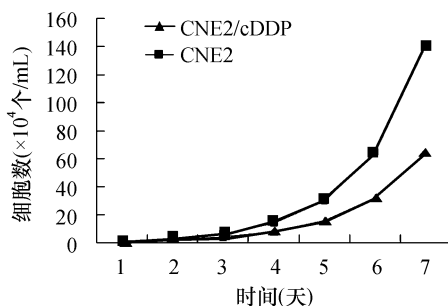


图 1 两种细胞的生长曲线

2.2 细胞形态

倒置显微镜下观察非耐药细胞株 CNE2 和耐药细胞株 CNE2/cDDP 的形态,发现两个细胞株均为贴壁性生长,非耐药细胞株 CNE2 形状比较规则,多边形,胞体较大,胞浆透亮;耐药细胞株 CNE2/cDDP 细胞较小,圆形,有较多的悬浮死细胞(图 2)。

2.3 不同药物的 IC_{50} 值及耐药指数

在不同药物作用下,耐药细胞株 CNE2/cDDP 较非耐药细胞株 CNE2 的 IC_{50} 值及耐药指数均有明显的增加,其中 CNE2/cDDP 细胞对顺铂的耐药性最强,增加到 200.6 倍,对 5-Fu 的耐药性最差,增加

到 2.8 倍(表 1)。

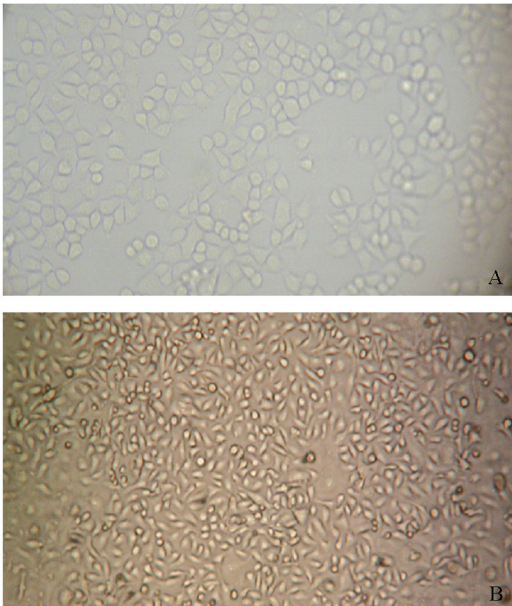


图 2 两种细胞倒置显微镜下形态比较 (×100) A: CNE2; B: CNE2/cDDP

表 1 不同药物在 CNE2 和 CNE2/cDDP 中的 IC₅₀ 值及耐药指数

化疗药物	IC ₅₀ (μmol/mL)		耐药指数
	CNE2	CNE2/cDDP	
顺铂	1.2245 ± 0.04217	245.6755 ± 1.03360	200.6
长春新碱	1.8235 ± 0.05120	212.1232 ± 0.93210	116.3
卡铂	2.1543 ± 0.08750	89.2314 ± 0.54660	41.4
紫杉醇	0.9431 ± 0.05632	18.4524 ± 0.96730	19.5
5-FU	83.1231 ± 5.83690	234.8443 ± 9.33310	2.8

3 讨 论

顺铂(cDDP)是临床上广泛使用的抗肿瘤药物,具有细胞毒性和放疗增敏性,其耐药性往往引起临床上鼻咽癌的化疗失败^[4]。cDDP 耐药的分子机制可能与其能减少药物的蓄积、药物代谢失活和增加 DNA 修复有关^[5]。为进一步研究其耐药分子机制,建立 cDDP 耐药的肿瘤细胞株很有必要。

近年来,随着临床化疗的普遍开展,不少肿瘤患者均出现了对 cDDP 耐药现象,为研究顺铂耐药分子机制,国内不少学者建立过不同肿瘤的顺铂耐药细胞株,如卵巢癌顺铂耐药细胞株 COC1/DDP、肺腺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP、人胃癌顺铂耐药细胞株 BGC-823/cDDP 等^[6-8],但有关顺铂耐药鼻咽癌的研究目前尚少见。目前国内的细胞中心也无法购买到

鼻咽癌耐药的细胞株,因此,基于实验研究需要,本研究构建鼻咽癌耐药细胞株,并进一步研究其耐药分子机制。一般稳定的耐药细胞系的获得需经过 10 代以上的筛选,本研究通过浓度逐步递增方法,经过 4 周左右的时间建立了鼻咽癌顺铂耐药细胞系 CNE2/cDDP,并对其生长情况和耐药情况进行了研究。

在肿瘤细胞耐药诱导过程中,鼻咽癌细胞会出现细胞形态上的明显改变,并伴有细胞生长速度变得缓慢。在诱导过程中,本研究发现,当顺铂浓度增加时,往往会引起相应的死亡细胞数目增加,而存活的细胞往往呈点灶状分布于培养瓶内,细胞开始表现为胞浆内出现空泡,细胞形态变得不规则,有较多突起形成。在换药间歇期或者更换不含药物的新鲜培养基后,细胞在短期内也很难恢复以前的形态和生长速度。在药物诱导过程中,一直保持着增殖活性的细胞可以发生分裂增殖产生新的细胞,再被药物诱导杀死,保留部分具有增殖活力的细胞,这个过程不断循环,使得获得了对某些药物具有耐药性的细胞克隆被诱导和分离出来,最后经过扩增获得了鼻咽癌的耐药细胞系,命名为 CNE2/cDDP。

本研究发现,鼻咽癌顺铂耐药细胞系 CNE2/cDDP 在倒置显微镜下观察,其细胞较 CNE2 为小,有较多的悬浮死细胞,其细胞倍增时间也较 CNE2 为长,说明耐药细胞系的生长与亲本细胞之间存在明显差异。MTT 实验研究该耐药细胞系对临床上 5 种常用药物的耐药性,发现在不同药物(顺铂、长春新碱、卡铂、紫杉醇、5-FU)作用下,耐药细胞株 CNE2/cDDP 较非耐药细胞株 CNE2 的 IC₅₀ 值及耐药指数均有明显的增加,其中 CNE2/cDDP 细胞对顺铂的耐药性最强,增加到 200.6 倍,对 5-Fu 的耐药性最差,增加到 2.8 倍。说明 CNE2/cDDP 不光对顺铂耐药,对其他临床上常用的化疗药物也具有耐药性,具有多药耐药特性,并且该细胞系性状稳定,可稳定地传代和保存,是较为理想的用于鼻咽癌的多药耐药研究的细胞系,进一步的细胞和分子生物学研究将有助于揭示其耐药的分子机制。

参考文献:

[1] Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ, et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance [J]. Drug Resist Updat, 2011, 14(3): 150-163.

(上接第 439 页)

- [2] 程爱兰,彭娟,张杨,等. Annexin I 表达下调与鼻咽癌分化转移的关系[J]. 中南医学科学杂志,2011,39(3):253-257.
- [3] Cao SM, Simons MJ, Qian CN. The prevalence and prevention of nasopharyngeal carcinoma in China[J]. Chin J Cancer,2011,30(2):114-119.
- [4] Sumi K, Tago K, Kasahara T, et al. Aurora kinase A critically contributes to the resistance to anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F mutant-induced transformed cells[J]. FEBS Lett,2011,585(12):1884-1890.
- [5] Kamlesh S, Atish P, Rishil J, et al. Multidrug resistance

associated proteins in multidrug resistance[J]. Chin J Cancer,2012,31(2):58-72.

- [6] 周静,魏月华,蔡红兵,等. 卵巢癌细胞株 COC1、顺铂耐药细胞株 COC1/DDP 的蛋白质组学比较[J]. 武汉大学学报:医学版,2012,54(1):1-4.
- [7] 高贵洲,王建军,石思恩. P 型铜转运 ATP 酶(ATP7B)在肺腺癌细胞株 A549 中的表达与顺铂耐药的关系[J]. 中国肺癌杂志,2009,4:350-353.
- [8] 王攀,王崇树,魏寿江,等. 顺铂诱导的人胃癌耐药细胞 BGC-823/CDDP 的建立[J]. 重庆医学,2011,40(4):323-325.

(此文编辑:朱雯霞)