

两株耐紫杉醇人乳腺癌细胞 MCF-7 的比较

张小平 陶永辉¹ 花 慧 吴 静 张莲芬 张熔熔² 金 坚*

(江南大学医药学院分子药理研究室, 无锡 214122; ¹江苏省血吸虫病防治研究所, 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室, 无锡 214064; ²无锡市第二人民医院, 无锡 214002)

摘要 建立稳定的肿瘤多药耐药(MDR)细胞株是肿瘤MDR机制研究的基础, 以MCF-7细胞株为亲本细胞株, 采用低浓度加量持续诱导和高浓度短期作用分别建立MCF-7/Taxol^a和MCF-7/Taxol^b细胞模型, 并对其耐药谱、动力学周期变化、表形变化、细胞侧群分布、药物蓄积等生物学特性比较评价。结果表明, MCF-7/Taxol^a和MCF-7/Taxol^b细胞的紫杉醇(paclitaxel/Taxol)半数抑制浓度(IC₅₀)分别是亲代MCF-7细胞的525倍和330倍, 并且都对多种化疗药物交叉耐药; MCF-7/Taxol^a细胞S期细胞显著增加, G₁期细胞减少; MCF-7/Taxol^b细胞各个期变化不大; MCF-7/Taxol^a细胞P-糖蛋白(P-gp)、肺耐药相关蛋白(LRP)和还原型谷胱甘肽-S转移酶(GST π)的表达水平较亲代有显著增加, 而MCF-7/Taxol^b细胞GST π 的表达水平较亲代也有显著增加, 另外, 拓扑异构酶II (ToPoII)在两株耐药细胞中表达都明显下降, 而两株细胞雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)阳性都表达丢失; 光镜下耐药细胞MCF-7/Taxol^a明显变大并且形态不规则而MCF-7/Taxol^b变化不大; 电镜下MCF-7/Taxol^a表面纤维毛成小球状隆起和絮状, 而MCF-7/Taxol^b表面成絮状; MCF-7/Taxol^a撤药10天后细胞中有紫杉醇蓄积, 而MCF-7/Taxol^b中没有紫杉醇蓄积。两个模型都具有MDR的基本生物学特性, 可用于肿瘤MDR机制的研究, 通过两种耐药细胞的比较, 推测MCF-7/Taxol^b细胞是MCF-7/Taxol^a细胞的一个亚群。

关键词 紫杉醇; 多药耐药; 乳腺癌MCF-7; 比较

乳腺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 是威胁妇女生命安全的一大杀手, 生长迅速, 约一半的患者确诊时已失去手术机会, 目前化疗是大多数患者的主要治疗手段之一^[1]。乳腺癌细胞对化疗药物的耐药性特别是多药耐药(MDR)是导致乳腺癌化疗失败的重要原因。紫杉醇(paclitaxel/Taxol)是20世纪90年代问世的抗微管类抗癌药, 是目前公认的疗效最好、抗癌谱最广的药物之一, 对乳腺癌疗效显著, 但随之出现的耐药现象已成为影响临床疗效的障碍^[2]。因此紫杉醇的耐药问题日益受到关注, 但其耐药机制目前还不十分清楚, 可能是多因素、多环节、多基因参与的复杂过程。为了深入研究紫杉醇的耐药机制, 有必要建立耐药模型, 并以此寻找较为敏感的预测疗效的分子指标, 筛选有效的MDR逆转剂。

目前, 国内外已经有许多关于紫杉醇耐药细胞株的报道, 而耐紫杉醇的人乳腺癌MCF-7耐药细胞株的建立也有报道^[3-5], 但是已报道的该耐药株耐药指数不高、不够稳定, 没有系统的对其生物学特性进行评价。而本实验选择了同一种药物和同一株细胞而使用两种不同的方法分别建立了两株耐药细胞, 耐

药指数高、稳定性好, 而且对其重要的生物学特性进行了系统的评价并比较分析, 获得了一些颇有价值的信息。

本文对建立的两种耐药细胞株进行了比较系统的生物学特性比较, 旨在能够更深刻的阐明细胞多药耐药的机制和为设计新的药物靶点打下基础, 探索肿瘤原发性耐药细胞和获得性耐药细胞^[6]之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系MCF-7引自ATCC公司。培养基RPMI 1640为Gibco公司产品。胰蛋白酶、DMSO、碘化丙啶(PI)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-糖蛋白(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-S转移酶(GST π)、雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)免

收稿日期: 2007-11-28 接受日期: 2008-03-31

江苏省卫生厅资助项目(No.H200625)

*通讯作者。Tel/Fax: 0510-85918219, E-mail: jinjian31@hotmail.com

疫组化试剂盒均为福州迈新生物技术公司产品。阿霉素和磺酰罗丹明 B (sulfor rhodamine 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、紫杉醇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、北京世桥生物制药有限公司等。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)。培养液为含体积分数为 0.10 热灭活的小牛血清、160 IU/L 胰岛素、1×10⁵ U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的完全 RPMI 1640 细胞培养基。细胞传代时用含质量浓度 2.5 g/L 胰蛋白酶进行消化。

1.2.2 两种耐药细胞株的建立 低浓度加量持续诱导法^[7, 8]: 以紫杉醇对亲本 MCF-7 半数抑制浓度 (IC₅₀) 的 1/10 为起始浓度, 逐步提高细胞培养液中的紫杉醇浓度, 待细胞在每个紫杉醇浓度下稳定生长后再提高药物浓度, 同步监测紫杉醇对细胞的 IC₅₀, 此法建立的耐药细胞株命名为 MCF-7/Taxol^a。

高浓度短期作用法: 以 10 mg/L 紫杉醇作用对数生长期的亲本 MCF-7 细胞株, 24 h 后撤药培养, 待细胞稳定后继续培养 1~2 个月, 然后再用 20 mg/L 紫杉醇作用该细胞, 再让其稳定生长 1~2 个月, 以此方法分别再用紫杉醇浓度为 30 mg/L、40 mg/L 作用 2 次, 前后一共作用细胞 4 次, 同步监测紫杉醇对细胞的 IC₅₀, 此法建立的耐药细胞株命名为 MCF-7/Taxol^b。

1.2.3 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 MCF-7/Taxol^a 细胞、MCF-7/Taxol^b 细胞和同步传代的 MCF-7 亲代细胞, 96 孔板(Costar 公司)每孔接种 7×10³ 个, CO₂ 培养箱中常规培养。从第 2~6 天采用 SRB 法^[9], 酶标仪(Multiskan MK3, Thermo LabSystems 公司)下分别测量 A₅₄₀, 绘制细胞生长曲线, 根据 Patterson 公式计算细胞在对数期的倍增时间(T_d), $T_d = T \lg 2 / \lg(N_t / N_0)$ 。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。

1.2.4 低营养条件下细胞生长曲线测定 分别收获对数生长中期、生长状态良好的 MCF-7/Taxol^a 细胞、MCF-7/Taxol^b 细胞和同步传代的 MCF-7 亲代细

胞, 96 孔板每孔接种 7×10³ 个细胞, 用含 0.5% 小牛血清的培养基在 CO₂ 培养箱中常规培养, 从第 2 天开始到第 5 天采用 SRB 法分别测定细胞生长情况, 绘制细胞生长曲线。

1.2.5 电子扫描显微镜观察细胞形态 分别收集 MCF-7/Taxol^a 细胞、MCF-7/Taxol^b 细胞和同步传代的 MCF-7 亲代细胞各 5×10⁵ 个, 800 r/min 离心 5 min 后置于 4 °C 下用体积分数为 0.025 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, 用质量浓度为 0.1 mg/L 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, 在室温下依次用体积分数为 0.3、0.5、0.7、0.9 和 1.0 的乙醇梯度脱水, 置于醋酸异戊酯过渡, 临界点干燥, 离子溅射, 最后用扫描电镜观察。

1.2.6 细胞 MDR 检测 采用 SRB 法分别检测 MCF-7/Taxol^a 细胞、MCF-7/Taxol^b 细胞和同步传代的 MCF-7 亲代细胞对药物的敏感性。96 孔板每孔接种 7×10³ 个, 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, 酶标仪测量 A₅₄₀, 按下式计算抑制率:

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

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

$$\text{RF} = \text{耐药型细胞(MCF-7/Taxol)} \text{ IC}_{50} / \text{野生型细胞(MCF-7)} \text{ IC}_{50}$$

1.2.7 流式细胞术(FCM)分析细胞周期分布 分别收集 MCF-7/Taxol^a 细胞、MCF-7/Taxol^b 细胞和同步传代的 MCF-7 亲代细胞 (各 1×10⁹ 个/L), PBS 洗涤 2 次, 体积分数为 0.70 的冷乙醇 4 °C 固定过夜。离心, PBS 洗涤 2 次, 加 PI 染液和 RNA 酶 A, 37 °C 水浴 30 min 后, 用美国 Coulter 公司的 EPICS XL 型流式细胞仪分析^[10]。

1.2.8 免疫组化分析 收集培养的 MCF-7/Taxol^a 细胞、MCF-7/Taxol^b 细胞和同步传代的 MCF-7 亲代细胞, 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, 最后在光镜下选择细胞涂布比较均匀合适的区域细胞计数, 计算阳性细胞所占的比例, 即区域阳性细胞数 × 100% / 区域细胞总数。

1.2.9 细胞内含紫杉醇的鉴定 分别收集亲本细胞和两株耐药细胞各 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 0.1 ml 三蒸水中。高效液相色谱柱 Agilent ZOBAX C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇: 水(65:35); 流速: 1 ml/min; 检测波长: 227 nm; 进样量: 20 μl; 柱温为室温。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件作 *t* 检验分析 *P* 值

2 结果

2.1 MCF-7/Taxol^a 细胞模型的建立

MCF-7/Taxol^a 细胞模型以递增紫杉醇浓度体外连续培养 10 个月, 其在含 2.5 mg/L 紫杉醇的完全 1640 培养液中生长良好。SRB 法分析其对紫杉醇 IC₅₀ 为亲本 MCF-7 细胞的 525 倍, 撤药培养 6 个月后, 该细胞的 RF 依然保持在 200 倍以上; MCF-7/Taxol^b 细胞模型以高浓度的紫杉醇短期作用, 最终的 IC₅₀ 为亲本的 330 倍, 此模型历时 7 个月, 该耐药细胞液氮

中冷冻保存半年, 复苏细胞, 稳定后测其 RF, 依然保持在 200 倍左右。

2.2 MCF-7/Taxol 细胞模型的形态学分析

MCF-7/Taxol^a 细胞和同步传代的亲本 MCF-7 细胞在光镜下形态差异明显。亲本 MCF-7 细胞一致、单一, 细胞成团生长; MCF-7/Taxol^a 细胞大小不一, 有少数极大细胞, 部分细胞幼稚, 与亲本细胞相比明显增大; MCF-7/Taxol^b 细胞大小不一, 偶见较大细胞, 和亲本细胞相比未见有明显增大, 该耐药细胞依然保持成团生长的趋势(图 1)。

2.3 MCF-7/Taxol 细胞的生长情况

细胞生长曲线显示, 两株耐药细胞的生长速度比亲本细胞慢(图 2)。根据 Patterson 公式计算细胞在对数期的倍增时间, 结果表明两株耐药细胞[MCF-7/Taxol^a 的 T_d: (49.6±2.1) h, MCF-7/Taxol^b 的 T_d: (53.3±1.8) h]的 T_d 明显高于亲本细胞[亲本细胞 T_d: (40.5±1.1) h, 与亲本细胞相比 *P*<0.01]。在低营养 MCF-7/Taxol^a 和亲本 MCF-7 细胞, 后两者几乎不生长(图 3)。分析细胞周期分布条件下(0.5% 小牛血清),

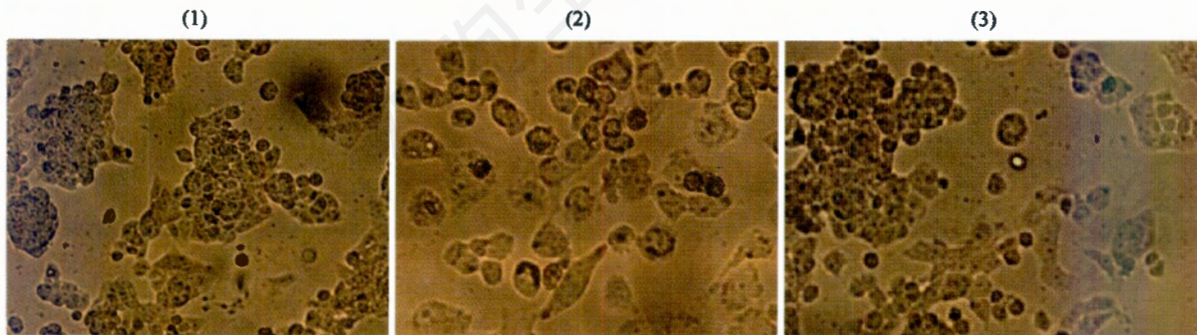


图 1 3 种细胞光镜照片(200×)

1: MCF-7 亲代细胞; 2: MCF-7/Taxol^a 耐药细胞; 3: MCF-7/Taxol^b 耐药细胞。

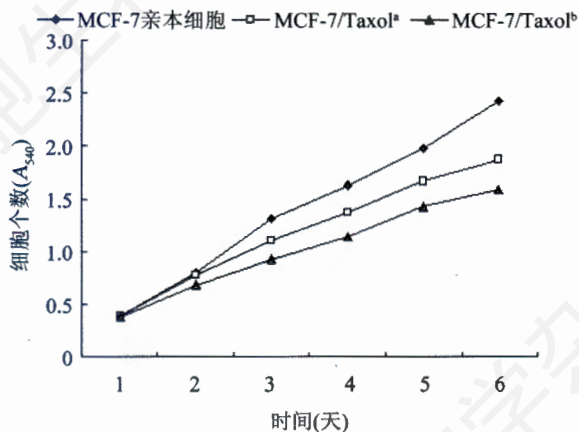


图 2 3 种不同细胞的生长曲线

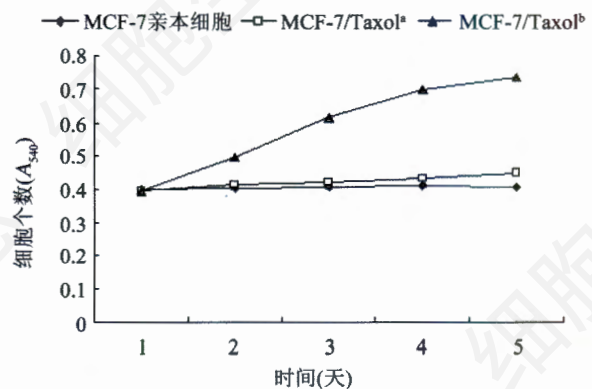


图 3 0.5% 小牛血清浓度下的细胞生长曲线

表1 细胞周期分析

细胞周期	MCF-7	MCF-7/Taxol ^a	MCF-7/Taxol ^b
G ₀ /G ₁ (%)	50.8	41.7	51.2
S (%)	28.8	36.5	27.8
G ₂ /M (%)	20.5	21.8	21.0

MCF-7/Taxol^b 细胞的生长状态优于耐药细胞发现, MCF-7/Taxol^a 与亲本细胞相比 G₁ 期明显减少, S 期增加; 而 MCF-7/Taxol^b 周期分布和亲本 MCF-7 细胞水平相当(表 1)。

2.4 扫描电镜照片下观察细胞形态的变化

亲本 MCF-7 细胞相邻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; MCF-7/Taxol^a 耐药细胞分散排列, 细胞呈球状, 轮廓较规整, 细胞表面部分区域呈现分

布均匀的絮状突起, 其余部分可见密集的大小不一的小球状突起; MCF-7/Taxol^b 耐药细胞相邻的两个大小相近, 细胞轮廓规则, 细胞表面大部分区域呈现絮状突起, 部分区域有大小不一的小球状隆起, 两者之间呈现局部交错状, 但球状隆起比 MCF-7/Taxol^a 要小(图 4)。

2.5 MCF-7/Taxol 细胞模型的 MDR

SRB 法分析显示, MCF-7/Taxol^a 细胞模型对博来霉素、表柔比星等 12 种临床上常用的乳腺癌化疗药可产生不同程度的耐药, 对顺铂、卡铂和吉西它滨无明显耐药性; 而 MCF-7/Taxol^b 细胞模型对这 15 种化疗药物产生不同的交叉耐药(表 2)。

2.6 细胞的免疫组化分析

P-gP、LRP 和 GST π 在耐药细胞 MCF-7/Taxol^a 中的阳性表达率显著高于亲本细胞; GST π 在耐药细

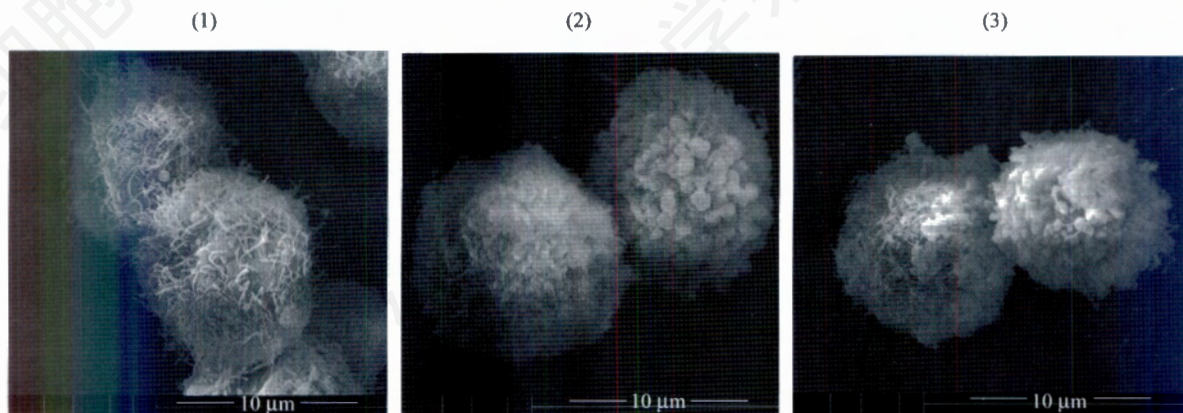


图4 3种细胞的扫描电镜照片

1: MCF-7 亲代细胞; 2: MCF-7/Taxol^a 细胞; 3: MCF-7/Taxol^b 细胞。

表2 细胞耐药性分析($\bar{x} \pm s, n=4$)

药物	IC ₅₀ (mg/L)			RF ^a	RF ^b
	MCF-7	MCF-7/Taxol ^a	MCF-7/Taxol ^b		
博来霉素	0.4±0.023	1.37±0.16	2.14±0.19	3.4	5.4
表柔比星	2±0.12	208.9±0.22	104±0.18	104.5	52
米托蒽醌	1±0.012	47.9±0.035	36.2±0.38	48	36
羟喜树碱	0.007±0.0010	5.75±0.021	2.18±0.14	821	311
依托泊苷	10±0.043	112.2±0.31	87.1±0.31	11	8.7
长春新碱	0.62±0.024	31.62±0.36	24±0.25	51	39
丝裂霉素	2±0.025	13±0.048	16.3±0.031	6.5	8
长春瑞滨	0.64±0.025	2.4±0.034	3.8±0.024	3.8	6
塞替派	3.8±0.012	25.7±0.11	16.3±0.10	7.3	4
多柔比星	0.289±0.013	117.5±0.22	77.6±0.31	406.6	268.5
吡柔比星	0.15±0.011	0.71±0.022	1.23±0.021	4.7	8.2
吉西他滨	0.09±0.021	0.17±0.015	0.33±0.017	1.9	3.7
顺铂	1.4±0.014	1.35±0.025	5.5±0.013	1	4
卡铂	34.5±0.21	35.5±0.15	223.5±0.75	1	6.6
甲氨喋呤	0.01±0.0011	0.07±0.0013	0.06±0.001 3	7	6

表 3 P-gP、LRP、ToPoII、GSTπ、ER、PR 在 3 株细胞中的阳性表达

试剂	MCF-7	MCF-7/Taxol ^a	MCF-7/Taxol ^b
P-gP	7%	75%	10%
LRP	2%	30%	3%
ToPoII	80%	40%	50%
GSTπ	45%	90%	90%
ER	30%	—	—
PR	70%	—	—

“—”表示阴性表达。

胞 MCF-7/Taxol^b 中的阳性表达率也高于亲本细胞, 而 P-gP、LRP 和亲本类似; ToPoII 在两株耐药细胞株中表达都有所下降; 而 ER 和 PR 在两株耐药细胞中明显丢失(表 3)。

2.7 细胞内紫杉醇的检测

用紫杉醇作为标准品, 经过高效液相色谱柱发现, 相同条件下, 相同时间处撤药 10 天的 MCF-7/Taxol^a 细胞有相应的峰值出现, 而亲本 MCF-7 和耐药 MCF-7/Taxol^b 细胞中没有检测到紫杉醇的存在(图 5)。

3 讨论

MDR 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生抗药性的同时, 对化学结构和作用机制不同的其他多种化疗药物产生交叉耐药的现象, 包括原发性 MDR 和继发性 MDR^[11], 是目前临床化疗失败及后期肿瘤复发的重要原因之一。紫杉醇是目前临床上常用的比较

有疗效的癌症化疗药物, 其作用机制主要是抑制微管聚合, 使纺锤体无法形成, 从而使细胞停止在有丝分裂中期^[12]。我们用紫杉醇建立了两株细胞耐药模型, 通过比较这两株细胞来获得更深的肿瘤细胞 MDR 的信息。

通过低浓度加量持续诱导的 MCF-7/Taxol^a 的 RF 为 525 倍, 而通过高浓度短期作用的 MCF-7/Taxol^b 的 RF 为 330 倍, 表明这两种模型都具有较高的耐药性, 同时 MCF-7/Taxol^a 撤药 6 个月和 MCF-7/Taxol^b 液氮中保存了半年复苏后都保持了较高的 RF, 这说明两株耐药细胞的稳定性比较好。实验中用高浓度短期作用于细胞的方法不同于以往, 以往报道^[13-15]是用高于亲本 IC₅₀ 数倍的药物浓度反复不断的、间隙的冲击细胞, 实质也是一种诱导, 属于继发性范畴, 而本试验避开了反复的诱导, 一次药物作用后大部分对药物敏感的细胞全部死亡, 少部分不敏感的存活下来, 每次药物作用时间间隔比较长, 细胞可以充分恢复, 实质是从亲本群中选择了药物天然不敏感的亚群, 属于原发性范畴。

在与两株多药耐药模型产生交叉耐药的药物中, 其中耐药指数最高的植物类抗肿瘤药羟喜树碱, 较高的是作用机制相同的表柔比星、米托蒽醌和阿霉素, 都属于嵌入 DNA 干扰转录 RNA 的药物, 硫酸长春新碱和长春瑞滨属于干扰蛋白质合成的药物, 其余属于干扰核酸(DNA 和 RNA)合成的药物。由此看出, 与紫杉醇相同的天然植物类化疗药和干扰转录 RNA 的

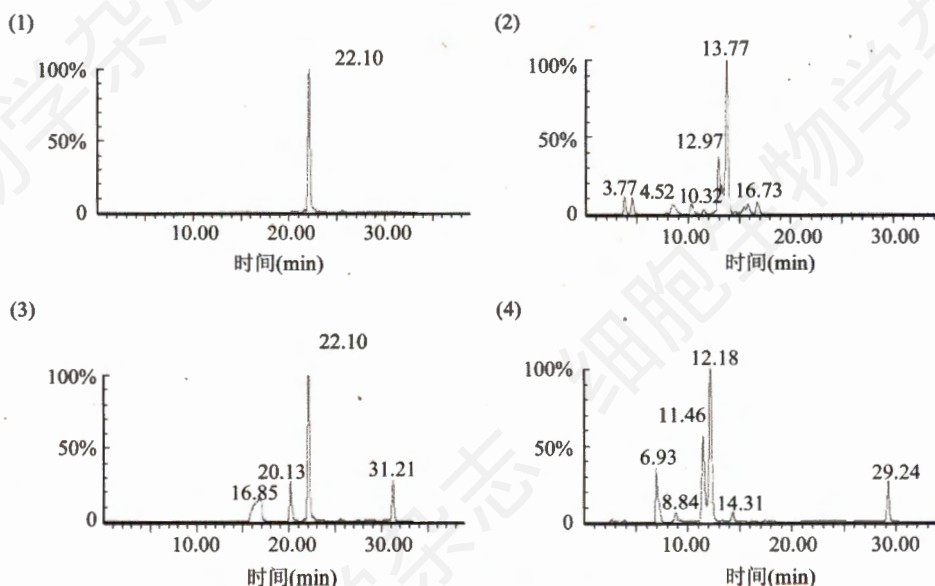


图 5 紫杉醇标准品和 3 株细胞内蓄积物的高效液相图谱

1: 紫杉醇标准品; 2: MCF-7 亲本细胞; 3: MCF-7/Taxol^a 耐药细胞撤药 10 天; 4: MCF-7/Taxol^b 耐药细胞。

药物在作用于细胞时有较为明显的交叉耐药情况,干扰蛋白质合成的药物(硫酸长春新碱和长春瑞滨)产生交叉耐药的现象也较为明显,其他的化疗药虽然属于同一作用机制,但由于具体作用部位不同,所以作用效果不同。模型 MCF-7/Taxol^a 中不产生交叉耐药的药物中,吉西他滨由于是前体药物因此对体外细胞没有明显的细胞毒性;金属铂类药物卡铂和顺铂也没有明显交叉耐药,在临床上可以优先考虑。可以看出,两个耐药模型细胞都具有广谱耐药性。同时,从中我们可以看出高浓度短期作用获得的耐药细胞 MCF-7/Taxol^b 对全部的 15 种化疗药物都有不同程度的交叉耐药性,提示亲本细胞株中先天性存在对药物不敏感的亚群。

细胞生长周期分析发现,两株耐药细胞的生长周期都要比亲本长,低浓度诱导的 MCF-7/Taxol^a 一直都生长在有药物压力的培养基中,紫杉醇作用是让细胞停滞在有丝分裂中期,影响细胞生长,直接导致细胞生长周期变长。MCF-7/Taxol^b 细胞是高浓度短期作用下从原代细胞中筛选出的先天性对紫杉醇不敏感的一个亚群,而其生长周期最长,其原因尚不清楚,推测该亚群细胞对周围的条件变化具有更高的自我调节能力(当周围的条件发生变化时,该细胞能够停滞生长)。

从免疫组化的结果中可观察到, MCF-7/Taxol^a 细胞中几种耐药相关蛋白的表达都有所增加;而 MCF-7/Taxol^b 细胞中只有 GST π 有所增加,但是两株耐药细胞中的 ER、PR 都转为阴性表达。提示 MCF-7/Taxol^a 细胞的 MDR 是多机制交叉介导的,而 MCF-7/Taxol^b 细胞的 MDR 可能和 GST π 的增加有关。另外,模型 MCF-7/Taxol^a 撤药 10 天的细胞中经 HPLC 检测发现有紫杉醇的蓄积;而模型 MCF-7/Taxol^b 细胞中没有发现紫杉醇的蓄积。提示模型 MCF-7/Taxol^a 细胞的 MDR 不单单是由 P-gp 介导的。

光镜下 MCF-7/Taxol^a 细胞明显大于亲本细胞,并且细胞形态非常不典型,大小不一,而 MCF-7/Taxol^b 细胞大小和亲本相似,并且保留了亲本的成团生长的

趋势。电镜下,亲本细胞表面布满不规则的纤绒毛,而由 MCF-7/Taxol^a 细胞表面可见,两个邻近的细胞不同,一个细胞表面有大量的小球状隆起,另外一个细胞表面成棉絮状,提示小球状隆起可能由绒样突起膨胀形成,而棉絮状可能由绒样舒展浓缩形成; MCF-7/Taxol^b 细胞表面成大量棉絮状,偶见类似 MCF-7/Taxol^a 细胞中小球状突起,但是球状突起比较小。从这几张光镜和电镜照片来看, MCF-7/Taxol^a 细胞中不止一个亚群,而 MCF-7/Taxol^b 细胞很可能就是被包括在其中的一个亚群。

另外,实验过程中发现, MCF-7/Taxol^b 细胞模型在每次给大剂量紫杉醇短期作用后,细胞约 90% 死亡,剩余 10% 的细胞一周内无生长迹象,一周后,细胞才恢复生长,并且生长缓慢。这一现象提示 MCF-7/Taxol^b 细胞对周围环境的适应能力较强,可能是导致肿瘤化疗失败的一个直接原因。

综上所述,本研究建立的两种耐药细胞模型,可为进一步研究紫杉醇的耐药机制、筛选有效的人乳腺癌化疗药物和 MDR 逆转剂提供了可靠的实验模型。另外,通过对两种耐药细胞株的比较,进一步揭开了肿瘤 MDR 的机制,让人们了解到肿瘤 MDR 的发生,原发性耐药细胞的存在是一个不可低估的因素,即人类癌症真正的元凶很可能就是先天性耐药细胞。

参考文献(References)

- [1] 杨纯正. 中华医学杂志, 2001, 81: 1475
- [2] 张小平等. 中国药理学通报, 2008(印刷中)
- [3] Guo B et al. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 85: 31
- [4] Kars MD et al. *Anticancer Res*, 2006, 26: 4559
- [5] Hill BT et al. *Invest New Drugs*, 1994, 12: 169
- [6] Collins AT et al. *Cancer Res*, 2005, 65: 10946
- [7] 杨爱珍等. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11: 657
- [8] 张洪新等. 癌症, 2000, 19: 748
- [9] 孙丽媛等. 北华大学学报(自然科学版), 2004, 5: 122
- [10] 严婷等. 细胞生物学杂志, 2006, 28: 591
- [11] 李西林等. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12: 9
- [12] Uchiyama-Kokubu N et al. *Anticancer Drugs*, 2001, 12: 769
- [13] Mimnaugh EG et al. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42: 391
- [14] Mozzetti S et al. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 298
- [15] Ueda K et al. *Anticancer Drug Res*, 1999, 14: 115

Comparison and Characteristics of Two Paclitaxel Resistant Human Mammary Adenocarcinoma MCF-7 Cell Strains

Xiao-Ping Zhang, Yong-Hui Tao¹, Hui Hua, Jing Wu, Lian-Feng Zhang, Rong-Rong Zhang², Jian Jin*
(Laboratory of Molecular Pharmacology, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
¹Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China; ²Wuxi No.2 People's Hospital, Wuxi 214002, China)

Abstract The foundation of cancer multidrug-resistant (MDR) study was establishment of a stable drug resistant cancer cell line. In this paper two lines of breast cancer cell named MCF-7/Taxol^a and MCF-7/Taxol^b with multidrug-resistance were established by gradually increasing concentration of paclitaxel (Taxol) and impacting with high dose of paclitaxel for short-time from the parent cell line MCF-7 *in vitro*, and their biological properties including drug-resistance, cell cycle dynamics, exterior transformation, and intracellular drug accumulation and so on, were analyzed. Results showed that the two cell lines were of good resistance to several chemotherapeutants for tumor. The IC₅₀ of MCF-7/Taxol^a to paclitaxel was 525 times higher than that of nature MCF-7, and the other was 330 times. The multiplication times of the two cell lines were longer than the nature cell. The proportion of MCF-7/Taxol^a cells in S-phase increased while those in G₁-phase decreased and MCF-7/Taxol^b was like the nature cells. The expression levels of P-gp, LRP and GST π on the cells of MCF-7/Taxol^a increased, and only the GST π on the cells of MCF-7/Taxol^b increased, and the TopoII on the cells of the two drug resistant cell strains decreased, but the both ER and PR was not observed. The morphology of MCF-7/Taxol^a became larger and irregular, and the surface of nature cell was the shape of floss, but MCF-7/Taxol^a was the shape of bead and fluffed cotton, MCF-7/Taxol^b was the the shape of fluffed cotton. The intracellular paclitaxel of MCF-7/Taxol^a was detected by HPLC even after 10-day culture in the medium (without paclitaxel), but not in MCF-7/Taxol^b. The results indicated both the two cell lines were typical MDR cell lines which have basic characteristics of drug resistance cells. By comparing the two cell lines, it may be that the MCF-7/Taxol^b was a cell subpopulation of MCF-7/Taxol^a.

Key words paclitaxel; multidrug-resistant; breast cancer MCF-7; comparison

Received: November 28, 2007 Accepted: March 31, 2008

This work was supported by the Health Bureau of Jiangsu Province (No.H200625)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-510-85918219, E-mail: jinjian31@hotmail.com