

• 论 著 •

人三阴性乳腺癌细胞耐药株的建立及特性研究*

吴月琴¹, 钟山亮², 张晓慧², 唐金海³, 赵建华^{2△}

(1. 南京医科大学研究生学院, 南京 211166; 2. 南京医科大学附属江苏省肿瘤医院临床检验中心, 南京 210009; 3. 江苏省肿瘤医院普外科, 南京 210009)

摘要:目的 建立人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的多西紫杉醇(Doc)耐药模型(MDA-MB-231/Doc)和表阿霉素(Epi)耐药模型(MDA-MB-231/Epi), 探讨其生物学特性。方法 采用 Doc 和 Epi 低浓度逐步加量诱导法历时 12 个月分别建立 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 耐药细胞株。通过细胞形态学观察、MTT 法和流式细胞术分析、比较其生物学特性, 实时荧光定量 PCR 检测多药耐药基因(MDR1)mRNA 表达, Western Blot 法检测 P 糖蛋白(P-gp)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2(Her-2)的表达状况。**结果** 所构建的 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 耐药株可分别在 12 nmol/L Doc 和 800 nmol/L Epi 中稳定生长, 在相同的药物浓度下, 耐药细胞株的生长增殖率明显高于亲代细胞, 其耐药指数分别为亲代敏感细胞的 8.32 倍和 64.93 倍, 且相互呈交叉耐药状态。与亲代细胞相比, 两株耐药细胞处于 G₁ 期和 G₂ 期的细胞增加、处于 S 期的细胞减少, 随撤药时间的延长, 细胞的增殖速度加快。两株耐药株的 MDR1 基因表达水平增高, 分别为亲代细胞的 4.05 倍和 5.96 倍, P-gp 表达为阳性。与 MCF-7 细胞株相比, MDA-MB-231 细胞株 ER、PR、HER2 表达阴性, 是典型的三阴性乳腺癌细胞株。**结论** 成功建立 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 的耐药细胞株, 其生长及耐药性稳定。

关键词: 乳腺癌细胞; 多西紫杉醇; 表阿霉素; 多药耐药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)15-2049-03

Establishment of drug-resistant cell lines of human triple negative breast cancer and study on their characteristics*

WU Yueqin¹, ZHONG Shanliang², ZHANG Xiaohui², TANG Jinhai³, ZHAO Jianhua^{2△}

(1. Graduate School, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 211166, China; 2. Clinical Laboratory Center, Affiliated Jiangsu Provincial Tumor Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 3. Department of General Surgery, Jiangsu Provincial Tumor Hospital, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: Objective To establish docetaxel (Doc) resistant MDA-MB-231/Doc model and epirubicin (Epi) resistant MDA-MB-231/Epi mode from triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 and to explore their biological characteristics. **Methods** The MDA-MB-231/Doc and MDA-MB-231/Epi drug-resistant cell lines were respectively established by gradually increasing Doc or Epi concentrations induction method in 12 months. The biological characteristics of the cell lines were compared by the cell morphological observation, MTT and flow cytometry; the real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect multi-drug resistance gene (MDR1) mRNA expression; the expression of P glycoprotein(P-gp), estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2) was detected by Western Blot. **Results** After the 12-month induction, the established MDA-MB-231/Doc could grow stably in the medium containing 12 nmol/L Doc, and MDA-MB-231/Epi could grow stably in the medium containing 800 nmol/L Epi; in the same drug concentration, the growth proliferation rate of the drug resistant cell line was significantly higher than that of the parental generation cells, their drug resistance indexes were 8.32 times and 64.93 times of parental generation sensitive cells, moreover which showed the mutual cross drug resistant status. Compared to the parental generation cells, the cells of stage G₁ and G₂ in two cell lines were increased and the cells of stage S were decreased, with the prolongation of drug withdrawal time, the cell proliferation speed was accelerated. The expression level of MDR1 gene was increased in the two drug-resistant cell lines, which were 4.05 times and 5.96 times of parental generation cells respectively, P-gp protein expression was positive. Compared with the MCF-7 cell line, ER, PR and Her2 expression in the MDA-MB-231 cell line was negative and typical triple negative breast cancer cell line. **Conclusion** The drug resistance cell lines of MDA-MB-231/Doc and MDA-MB-231/Epi are successfully established with stable growth and drug resistance.

Key words: triple negative breast cancer cell line; docetaxel; epirubicin; multidrug resistant

目前, 乳腺癌是中国女性发病率最高的癌症, 癌症死亡原因位居第六。每年中国乳腺癌新发数量和死亡数量分别占全

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272470)。

作者简介: 吴月琴, 女, 主管检验技师, 主要从事乳腺癌分子生物学的研究。△ 通讯作者, E-mail: jhzhao2838@sina.com。

世界的 12.2% 和 9.6%^[1]。三阴性乳腺癌(TNBC)是雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2(Her-2)均为阴性的一种特殊类型乳腺癌,约占所有乳腺癌的 10%~20%^[2]。它们具有特殊的分子表达特征、侵袭行为和转移模式,表现为对传统的内分泌治疗和靶向治疗均不敏感,局部复发和远处转移率高,预后极差。目前,多西紫杉醇(Doc)和表阿霉素(Epi)是三阴性乳腺癌患者最常用的药物,尤其是联合治疗可获得较好的控制效果^[3-4],但药物耐药常导致治疗的最终失败^[5-6]。本研究以人三阴性乳腺癌细胞敏感株 MDA-MB-231/S 为亲本细胞,通过低剂量逐渐加量法体外诱导建立系列耐药细胞株 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi,并对它们的耐药性和生物学特性进行研究,为探讨肿瘤细胞对化疗耐药的机制及体外逆转耐药的策略,克服当前化疗中存在的这一主要障碍构建研究平台。

1 材料及方法

1.1 主要试剂与仪器 人乳腺癌细胞敏感株 MDA-MB-231/S 和 MCF7/S 购买于上海生物制品研究所,引进于美国 ATCC。DMEM 高糖培养基(HyClone)、胎牛血清(杭州四季青)、胰蛋白酶(HyClone)、培养皿、Sigma 的四甲基偶氮唑盐(MTT)、兔抗人 P 糖蛋白(P-gp)单克隆抗体(Abcam)、兔抗人 ER 单克隆抗体(Abcam)、兔抗人 PR 单克隆抗体(Abcam)、兔抗人 Her-2 单克隆抗体(Abcam)、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(arigo)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠二抗(北京康为)及 HRP 标记的山羊抗兔二抗(Cell Signaling);MDR1 引物(由上海闪晶生物公司设计及合成)、超净工作台、倒置相差显微镜、电泳仪、转膜仪、美国 BD-FACSCalibur 流式细胞仪等。

1.2 方法

1.2.1 MDA-MB-231/S 细胞培养 MDA-MB-231/S 和 MCF7/S 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱培养。细胞用胰酶消化传代。

1.2.2 MD2A-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 耐药株的建立 在 MDA-MB-231/S 的基础上,通过低剂量逐渐加量法构建耐药细胞株。Doc 的药物浓度从 0.2 nmol/L 逐步加至 13 nmol/L;Epi 的浓度从 10 nmol/L 逐步到 800 nmol/L,整个过程历时一年左右。在进行后续试验前,细胞在无药培养基中培养 2 周以上,以排除药物的影响。

1.2.3 细胞的生长曲线、IC₅₀ 和相对耐药指数(RI) 取对数生长期的细胞,制成 1 $\times$ 10⁵/mL 的单细胞悬液,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,培养 24 h 后加入 100 μ L 含有不同药物浓度的完全培养基,每个药物浓度设 4 个复孔,同时设置空白对照和阴性对照。培养 48 h 后,每孔加 20 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,弃上清液,每孔加 150 μ L 的二甲基亚砷(DMSO),待晶体彻底溶解后,酶标仪 490 nm 检测吸光度。计算细胞生长增殖率和生长抑制率;生长增殖率=实验组平均吸光值/对照组平均吸光值 $\times$ 100%;生长抑制率=1-(实验组平均吸光值/对照组平均吸光值) $\times$ 100%。以药物浓度的对数作为纵坐标,以细胞生长增殖率作为横坐标,绘制细胞生长曲线;根据细胞生长抑制率计算细胞生长抑制所需的各药浓度

(IC₅₀)和 RI。RI=耐药细胞的 IC₅₀/亲代细胞的 IC₅₀。试验独立重复 3 次。

1.2.4 细胞周期分布 取对数生长期的细胞用胰酶消化制成 1 mL 的单细胞悬液,预冷的 70%乙醇固定,-20 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗脱 2 次,碘化丙啶(PI)避光染色 30 min,以美国 BD-FACS Calibur 流式细胞仪检测细胞周期。独立重复 3 次。

1.2.5 MDR1 基因相对定量测定 用胰酶消化细胞,总 RNA simple Total RNA Kit(离心柱型)试剂盒提取总的 RNA,测 A₂₆₀/A₂₈₀ 值并计算其纯度和 RNA 含量;按 BU-Script RT KIT 试剂盒说明,反转录合成 cDNA。取 1 μ L cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR(LightCycle LC480 扩增仪)。多药耐药(MDR)1 引物:上游 5'-GTT GCT GCT TAC ATT CAG GTT TC-3',下游 5'-ACC AGC CTA TCT CCT GTC GC-3'; β -actin 引物:上游 5'-CAC CTT CTA CAA TGA GCT GCG TGT G-3',下游 5'-ATA GCA CAG CCT GGA TAG CAA CGT AC-3'。以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 计算 MDR1 mRNA 的相对表达量。

(6)Western Blot 检测 ER、PR、Her-2 和 P-gp 的表达:提取蛋白,测蛋白浓度。蛋白上样量由蛋白浓度换算,80 V 电泳 20 min,120 V 电泳 2 h;300 mA 湿转 2 h;室温 5%牛奶封闭 1 h;兔抗人 P-gp 单克隆抗体(1:2 000)、兔抗人 ER 单克隆抗体(1:800)、兔抗人 PR 单克隆抗体(1:2 000)、兔抗人 HER2 单克隆抗体(1:10 000)及鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(1:10 000),4 $^{\circ}$ C 过夜;HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:4 000)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:2 000),室温 1 h;ECL 液暗室发光显影。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态 MDA-MB-231/S 贴壁生长,呈长梭形或多角形,排列均匀。加入 Doc 1 周后细胞变细,变长,核染色质变粗糙;加入 Epi 1 周后细胞胞体变大,核质比增加。加入药物后敏感细胞不断死亡,需数次换液不断清除死细胞,仅存少量贴壁细胞。去药 2 周后,细胞开始少量成团生长,去药 4 周后细胞基本恢复。见图 1。

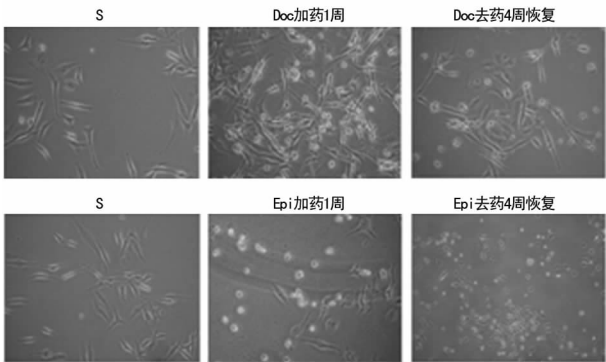


图 1 倒置显微镜观察多西紫杉醇和表阿霉素作用前后 MDA-MB-231/S 细胞形态变化($\times$ 100)

2.2 细胞耐药特性 与 MDA-MB-231/S 相比,在相同的药物浓度下,MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 对 Doc 和 Epi 有较高的耐药特性(图 2),并且其之间交叉耐药(表 1)。

2.3 细胞周期 经流式细胞仪分析,MDA-MB-231/S 的 G_0/G_1 期细胞占总细胞的 53.70%, G_2/M 期占 16.90%,S 期占 29.40%,细胞凋亡 4.53%;MDA-MB-231/Doc 细胞, G_0/G_1 期细胞占总细胞的 55.46%, G_2/M 期占 22.33%,S 期占

22.22%,细胞凋亡 1.68%;MDA-MB-231/Epi 细胞, G_0/G_1 期细胞占总细胞的 61.21%, G_2/M 期占 9.61%,S 期占 29.10%,细胞凋亡 1.58%。结果表明 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 处于 G_0/G_1 期细胞增加,S 期细胞减少,凋亡减少。

表 1 MDA-MB-231/S、MDA-MB-231/Doc、MDA-MB-231/Epi 细胞的耐药特性($n=3$)

药物	MDA-MB-231/S 的 IC ₅₀ ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)	MDA-MB-21/Doc		MDA-MB-21/Epi	
		IC ₅₀ ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)	RI	IC ₅₀ ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)	RI
Doc	2.75±0.26	22.89±4.71	8.32	6.92±1.90	2.51
Epi	0.16±0.03	1.24±0.35	7.78	10.39±2.67	64.93

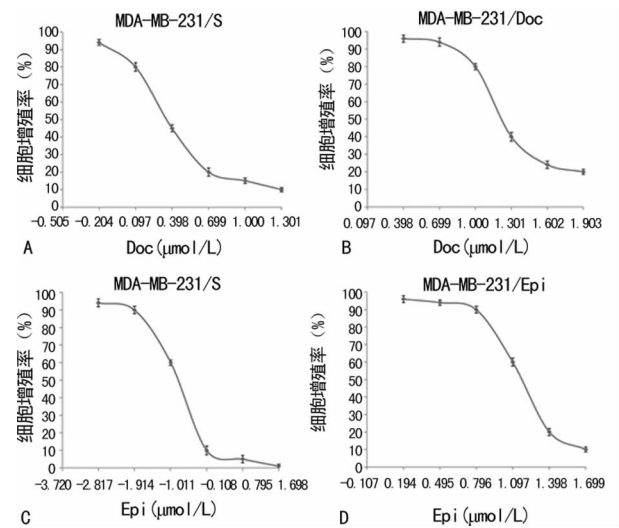


图 2 不同的药物浓度下,MDA-MB-231/S 与 MDA-MB-231/Doc、MDA-MB-231/Epi 生长增殖率的比较

2.4 MDR1 基因相对定量 RT-qPCR 结果显示,MDA-MB-231/Doc 细胞 MDR1 mRNA 表达水平是 MDA-MB-231/S 的 4.05 倍($P<0.05$);MDA-MB-231/Epi 细胞 MDR1 mRNA 表达水平是 MDA-MB-231/S 的 5.96 倍($P<0.05$)。见图 3。

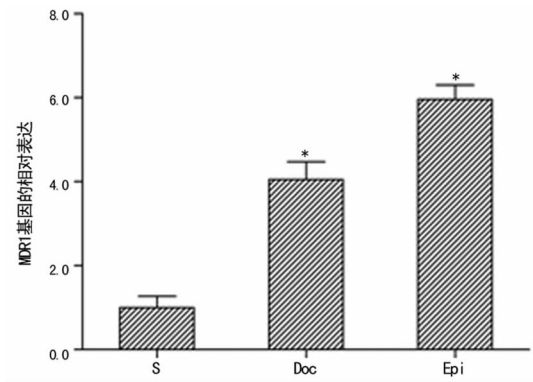
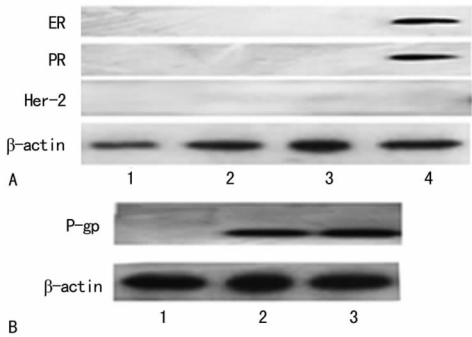


图 3 MDA-MB-231/S、MDA-MB-231/Doc、MDA-MB-231/Epi 细胞 MDR1 基因的相对表达

2.5 Western Blot 结果 结果显示 MDA-MB-231/S、MDA-MB-231/Doc、MDA-MB-231/Epi 与 MCF-7/S 相比,ER、PR 和 Her-2 缺失,表现为三阴性。MDA-MB-231/Doc、MDA-MB-231/Epi 与 MDA-MB-231/S 相比 P-gp 表达阳性。结果见图 4。



注:1 为 MDA-MB-231/S;2 为 MDA-MB-231/Doc;3 为 MDA-MB-231/Epi;4;MCF-7/S。

图 4 4 株乳腺癌细胞中 ER、PR、Her-2 及 P-gp 蛋白的表达

3 讨 论

MDR 是临床化疗急需攻克的难题,其耐药相关机制仍未阐明^[7-8]。通过一年低浓度逐渐加量法诱导成功的 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 与 MDA-MB-231/S 相比,耐药细胞株对 Doc、Epi 有较强的耐药,并且相互之间交叉耐药。同时耐药细胞株 G_0/G_1 期的细胞增加,S 期细胞减少,凋亡减少。说明耐药细胞株在建模中经诱导获得耐药性后处于慢周期甚至静息状态,耐药株对化疗药物的敏感度降低,具备了 MDR 的特性。

P-gp 过表达是目前公认的 MDR 生物学基础,也被认为是耐药细胞经典或最基本的标志^[9]。P-gp 是人类 MDR 基因家族中,与耐药有关的 MDR1 基因编码。它不仅作为药物,外排泵保护细胞免受有毒物质侵袭,而且还可参与细胞的增殖、分化和凋亡,介导 MDR 产生^[10]。RT-qPCR 及 Western Blot 检测到与亲代细胞相比,MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 的 MDR1/P-gp 表达上调。证实 P-gp 在 Doc 和 Epi 获得性耐药过程中被诱导产生并起关键作用。同时运用人乳腺癌细胞株 MCF-7/S 与 MDA-MB-231/S、MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 相比,三阴性乳腺癌细胞株的 ER、PR 和 Her2 表达阴性。进一步说明了与其他类型乳腺癌相比,传统的治疗方法对于三阴性乳腺癌效果不明显。而对于相对有效的化学药物治疗^[11-12],MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-231/Epi 耐药模型的建立,为进一步深入研究 Doc 和 Epi 的耐药逆转机制和三阴性乳腺癌的治疗策略提供了(下转第 2054 页)

义,原因可能与布鲁菌为胞内寄生菌,骨髓中含有大型吞噬细胞,布鲁菌含量较高有关。

另外,布鲁菌是生物危害极强的高致病性病原体,病菌污染环境后形成气溶胶,可发生呼吸道感染,特别是临床微生物室更是布鲁菌感染的高危区,可导致实验室获得性感染,引起实验室内暴发流行,应注意提高生物安全防护级别,操作应在生物安全柜内进行^[11]。同时要求实验室制订严格的操作规程,严格消毒实验相关器械,防止实验室泄露,并且加强员工培训教育,提高实验室工作人员的警惕性,以减少接触(暴露)危险病原体的风险。

总之,我们要充分认识布鲁菌病,需要引起医院、临床医师和检验人员的高度重视,不断提高业务水平,加强与临床沟通,多学科交流,开拓诊疗思路,可以提高该病的诊断率及减少误诊率,减轻患者的痛苦和医疗费用。

参考文献

[1] 倪语星,尚红. 临床微生物学检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:162-163.

[2] 田林. 人畜共患病防控工作开始起步[J]. 农业知识(科学养殖),2012,9(3):59-61.

[3] 丁芹,王莉娜,潘玉,等. 徐州地区 30 例布鲁菌病的临床特征分析[J]. 中外医学研究,2014. 12(36):1-4.

[4] 中华人民共和国卫生部. 布鲁氏菌病诊断标准及处理原则:GB15988-1995[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,

1996.

[5] 陈东科,孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:496-498.

[6] Fanni F, Shahbaznejad L, Pourakbari B, et al. Clinical manifestations, laboratory findings, and therapeutic regimen in hospitalized children with brucellosis in an Iranian Referral Children Medical Centre[J]. J Health Popul Nutr, 2013, 31(2):218-222.

[7] Kassiri H, Amani H, Lotfi M. Epidemiological, laboratory, diagnostic and public health aspects of human brucellosis in western Iran[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2013, 3(8):589-594.

[8] Dhar R, Dhar PM, Gafoor M. Recurrent epidermal cyst infection caused by *Brucella melitensis* in a diabetic patient [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(5):1040-1041.

[9] 欧内玉,冯慧. 研究布鲁菌血培养阳性在不同时间段的阳性率[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(9):1199-1200.

[10] 王小涛. 非传统流行区布鲁菌病 3 例诊疗分析[J]. 中国人兽共患病学报,2014,30(12):1281-1282.

[11] 董兰梅. 一例马耳他布鲁菌血流感染病例报道[J]. 检验医学,2015,30(3):291-294.

(收稿日期:2015-08-05 修回日期:2016-05-21)

(上接第 2051 页)
可靠的实验模型和参考依据。

参考文献

[1] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7):e279-e289.

[2] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours [J]. Nature, 2000, 406(6797):747-752.

[3] Naumova E, Ubezio P, Garofalo A, et al. The vascular targeting property of paclitaxel is enhanced by SU6668, a receptor tyrosine kinase inhibitor, causing apoptosis of endothelial cells and inhibition of angiogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6):1839-1849.

[4] 刘为军,王昆华,龚昆梅,等. 乳腺癌研究及治疗新靶点——乳腺癌干细胞的研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(1):66-69.

[5] 刘春萍,栗东雪,马锌. 紫杉醇联合表阿霉素治疗乳腺癌不良反应的护理[J]. 临床合理用药杂志,2013,6(30):68-69.

[6] 谢联斌,谢莉,袁丽方. 多西紫杉醇联合卡培他滨治疗蒽环类耐药晚期三阴性乳腺癌的临床观察[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版),2010,4(3):339-342.

[7] 王丽,曹波,曹译心,等. 三阴性和非三阴性乳腺癌中耐药蛋白的差异表达及临床意义[J]. 现代医药卫生,2014,30(16):2433-2435.

[8] Germano S, O' driscoll L. Breast cancer: understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalised medicine[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9(3):398-418.

[9] Mizutani T, Masuda M, Nakai E, et al. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1) [J]. Curr Drug Metab, 2008, 9(2):167-74.

[10] Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(20):3271-3277.

[11] Maia AR, De Man J, Boon U, et al. Inhibition of the spindle assembly checkpoint kinase TTK enhances the efficacy of docetaxel in a triple-negative breast cancer model [J]. Ann Oncol, 2015, 26(10):2180-2192.

[12] Tzeng HE, Yang L, Chen K, et al. The pan-PI3K inhibitor GDC-0941 activates canonical WNT signaling to confer resistance in TNBC cells: resistance reversal with WNT inhibitor[J]. Oncotarget, 2015, 6(13):11061-11073.

(收稿日期:2016-01-19 修回日期:2016-05-03)