DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2015.04.003

吉西他滨耐药的胰腺癌 SW1990 细胞株的建立及相关特性检测

贾一夫[1],丁 飞[1],余 跃[1],高 萌[1],杨显珠[2],王 均[2]

摘要 **目的** 探讨对吉西他滨(GEM)耐药的胰腺癌SW1990细胞诱导方法,以期进一步认识胰腺癌耐药的发生机制,并对诱导的GEM耐药的胰腺癌细胞与其亲本细胞的生物学特性进行比较。**方法** 采用逐步浓度递增法诱导对GEM耐药的细胞株SW1990-GZ。MTT法检测SW1990和SW1990-GZ的半数致死量(IC_{50})、耐药系数(R),并观察其生长差异。采用高效液相色谱法(HPLC)检测不同时间点SW1990和SW1990-GZ对GEM药物的摄取情况。**结果** SW1990和SW1990-GZ的IC_{50}为(0.07±0.002 1)、(87.50±3.240 0)μg/ml,R=1 250;在不同浓度GEM作用下,诱导后耐药的SW1990-GZ对GEM的敏感性明显降低。细胞生长曲线显示耐药细胞SW1990-GZ相对于SW1990生长缓慢。不同时间点GEM孵育后,SW1990-GZ细胞对GEM药物的摄取较SW1990细胞降低。**结论** 成功诱导了耐GEM药物的SW1990-GZ细胞株,耐药性能稳定、明显。SW1990-GZ细胞可能存在着一定的机制使得细胞摄取GEM降低。

关键词 人类胰腺癌细胞株;吉西他滨耐药;建立
中图分类号 R 735.9
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)04-0419-04

胰腺癌是预后最差的人类实体瘤之一,其5年生存率不足5%[1]。大部分胰腺癌患者初诊时已错过手术切除机会,对放疗敏感性低,对化疗药物易产生耐药性。吉西他滨(gemcitabine,GEM)是胰腺癌临床一线治疗用药,相对于传统化疗药物,其不仅提高了有效率,而且大大改善了患者的生活质量。但随着临床上GEM耐药性的出现,使得其药效的发挥大打折扣[2]。因此,构建耐GEM的胰腺癌细胞并研究耐药机制是当前胰腺癌防治最迫切的研究课题。该实验以人胰腺癌SW1990细胞为研究对象,构建对GEM耐药的胰腺癌细胞株,并对耐药细胞与亲本细胞的一些特性进行检测与比较。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及细胞系株 人胰腺癌细胞株SW1990(中科院上海细胞库);GEM(法国Lilly公司);RPMI-1640、胎牛血清(美国Gibco公司);四氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 耐药细胞SW1990-GZ的建立 耐药细胞株SW1990-GZ为SW1990细胞株由GEM经浓度递增法逐步诱导获得,简述如下。不同浓度的GEM培养SW1990细胞1周后,观察细胞死亡情况,筛选出SW1990细胞的半数致死量(median lethal dose,IC_{50})为0.07 μg/ml,加入GEM至终浓度为0.1 μg/ml,在培养箱内共同培养48 h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箱后,进入对数生长期后,传代2次,在重复同一剂量的药物培养;至较稳定后在0.4 μg/ml的GEM中继续培养,依此每次使药物浓度4倍递增,最终使药物浓度达到400 μg/ml;如此反复递增加药,筛选存活细胞继续培养后,直至其对高浓度的GEM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,历时10个月获得对GEM药物稳定耐受的细胞株SW1990-GZ。培养SW1990-GZ经历多代传代后可定期向培养基中加入4 μg/ml GEM以维持细胞耐药性。

1.2.2 MTT法检测SW1990和SW1990-GZ对GEM的敏感性 取对数生长期SW1990及SW1990-GZ细胞经PBS清洗胰酶消化后进行计数。取适当的细胞培养液接种于96孔板,细胞密度为5 000/孔,每孔液体量100 μl/孔;置于37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱孵育培养24 h后,去除每孔中旧培养液,并向

2015-01-27 接收
基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH174)
作者单位:[1]安徽医科大学附属省立医院消化内科,合肥 230001
[2]中国科学技术大学生命科学学院合肥微尺度物质科学国家实验室,合肥 230027
作者简介:贾一夫,男,硕士研究生;
余 跃,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:yuyuemd@163.com;
王 均,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:jwang699@ustc.edu.cn

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其中加入含不同浓度 GEM 的培养基继续温箱孵育 72 h，弃去培养基；每孔加入以无血清 RPMI-1640 培养基稀释的 0.5 mg/ml 的 MTT 100 μl，37 ℃孵育 4 h，弃上清液；每孔加入 DMSO 150 μl 溶解，室温振荡 15 min，于 490 nm 处应用自动酶标仪检测吸光度（optical delnsity，OD）值。每个药物浓度设置 4 个复孔，以种细胞不加药孔为对照组及以无细胞不加药的孔为空白对照组。不同浓度 GEM 作用下计算细胞存活率。细胞存活率（%）=（加药细胞 OD 值 - 空白对照 OD 值）/（对照细胞 OD 值 - 空白对照 OD 值）×100%。计算耐药细胞系 SW1990-GZ 的耐药系数（R）。R = SW1990-GZ 细胞的 IC_{50}/SW1990 细胞的 IC_{50}。绘制剂量 - 细胞存活率曲线，每项实验至少重复 3 次。

1.2.3 细胞生长曲线的绘制 取对数生长期的 SW1990 及 SW1990-GZ 细胞经 PBS 清洗，胰酶消化后制成单细胞悬液后，经细胞计数器进行计数后分别接种于 24 孔板，细胞密度 5 000/孔，液体量 500 μl/孔。置于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱孵育培养，于种板后第 1 天开始用 MTT 比色法进行细胞生长检测，即向每孔中加入 MTT 溶液 500 μl 孵育 4 h 后，向每孔加入 DMSO，随后进行酶标仪下 490 nm 的 OD 值检测。每天 1 计，共计数 8 d，每种细胞每次计数设 3 个复孔。

1.2.4 高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）检测细胞摄取情况 取对数生长期细胞进行清洗消化后吹打成单细胞悬液，计数后取相应量进行 24 孔板接种，细胞密度 1×10^5/孔，液体量 0.5 ml/孔。恒温培养箱孵育 24 h 后向每孔中加入含 GEM 的培养基 0.5 ml，GEM 浓度 200 μg/ml。从加药开始计时，分别设定 2 h 与 4 h 的细胞摄取时间，每个时间点 2 个复孔，以不加药的细胞孔为空白对照。到时间后吸去含药培养基，并用 PBS 清洗 3 次，向每孔中加入 1% SDS + 2% Triton 的细胞裂解液进行常温下裂解以释放药物，该操作结束可进行冻融促进更进一步裂解细胞。充分裂解后用 0.5 ml 甲醇萃取，涡旋震荡充分，混匀萃取除蛋白及碎片，10 000 r/min 离心 10 min。取上清液弃沉淀，样品旋干除去有机萃取剂。旋干后样品定容到 100 μl 后进行 HPLC 检测。HPLC 检测参数：柱温 30 ℃，紫外检测波长 268 nm，流动相如下：醋酸铵（pH = 5.5，0.05 mol/L）：甲醇溶液 = 85 ∶ 15。外标法建立标准曲线，计算 SW1990-GZ 及 SW1990 细胞的萃取效率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示；组间变量比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 SW1990-GZ 细胞与亲本细胞生物学特性的比较

2.1.1 检测 SW1990-GZ 及 SW1990 对 GEM 药物的敏感性 经 MTT 试验显示，在各个浓度的 GEM 的作用下，SW1990-GZ 细胞相较于诱导耐药前的 SW1990 细胞显现出显著 GEM 耐受性，即 SW1990-GZ 细胞对 GEM 的敏感性急剧下降，差异均有统计学意义（$t = 6.562$，$P < 0.01$）。SW1990 与 SW1990-GZ 关于 GEM 的 IC_{50} 值为（0.07 ± 0.002 1）、（87.50 ± 3.240 0）μg/ml，R = 1 250。SW1990-GZ 和 SW1990 细胞的药物浓度 - 细胞存活率曲线见图 1。

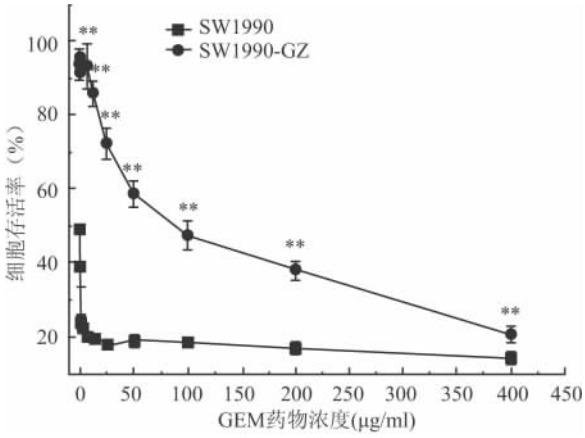

图 1 SW1990-GZ 及 SW1990 对 GEM 药物的敏感性

与 SW1990 比较：** $P < 0.01$

2.1.2 SW1990-GZ 与 SW1990 生长趋势的检测 最终绘制的生长天数 - MTT OD 值曲线见图 2，表明与 SW1990 细胞相比，SW1990-GZ 细胞系生长增殖较缓慢（$t = 3.611$，$P < 0.05$）。

2.2 HPLC 检测 SW1990-GZ 与 SW1990 细胞对 GEM 药物的摄取情况 实验中，SW1990-GZ 细胞的萃取效率为 80.26%，SW1990 系的萃取效率为 83.12%。在摄取 2 h 后经 HPLC 检测，SW1990 细胞与诱导耐药后的 SW1990-GZ 细胞比较，胞内药物浓度显著增高（$t = 7.047$，$P < 0.05$）；4h 后，SW1990

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

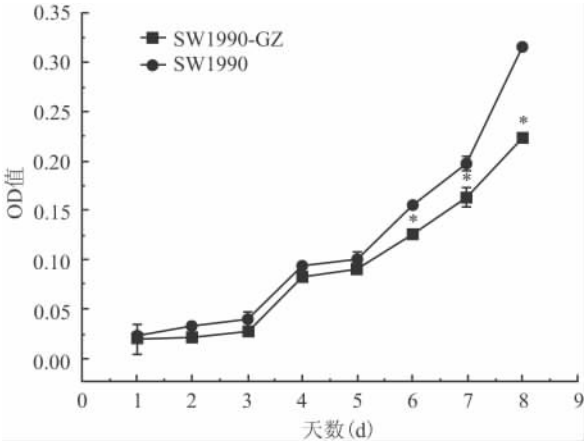

图2 SW1990-GZ 与 SW1990 生长趋势比较

与 SW1990 **细胞比较:*** $P<0.05$

细胞胞内药物浓度仍高于 SW1990-GZ 细胞($t=14.81$, $P<0.01$)。见图3。

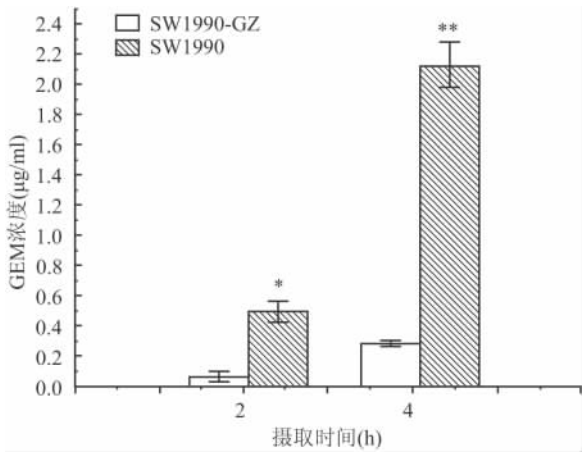

图3 HPLC 检测 SW1990-GZ 与 SW1990 对 GEM 药物的摄取

与同一摄取时间 SW1990-GZ **细胞比较:*** $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

构建肿瘤耐药的癌细胞系方法有多种,如基因转染法、药物诱导筛选法等[3]。本实验采取 GEM 药物浓度间歇递增的方法对原本不耐受 GEM 的亲本 SW1990 细胞进行长期诱导,最终经过 10 个月才成功构建对 GEM 耐药 SW1990-GZ 细胞株。在进行诱导细胞耐药的过程中,有以下问题需要注意:① 先需对亲本细胞进行最基本的 GEM 药物敏感性的检测以获得 IC_{50},然后根据此浓度,筛选出一个适宜的初始浓度,再进行细胞耐药性诱导;② 在加大剂量进行下一步诱导前,需将细胞培养基换成不含 GEM 的完全培养基培养至细胞生长稳定,否则持续让细胞处于不同药物浓度更换下,其细胞状态没有恢复到最佳,容易导致诱导试验的失败;③ 强调 GEM 药物浓度梯度合适,间歇递增的梯度过大或过小均不利于稳定耐药性的获得;④ 耐药细胞的建立过程,关键是要有基本的细胞培养学知识与技术,在培养过程中要小心谨慎,防止细胞培养操作过程中的细胞污染而造成细胞死亡。本研究经过 MTT 法检测细胞对 GEM 的敏感性及 HPLC 检测细胞对 GEM 的摄取,证实诱导耐药的 SW1990-GZ 细胞株有良好的耐药特性且耐药性稳定明显,这使得该耐药细胞株有望成为后期实验探讨 GEM 耐药机理及如何攻克细胞耐药的理想细胞模型。间歇浓度梯度递增法在给药时间上类似于临床胰腺癌化疗的时间周期,故通过此法得到的研究结果可能对临床更有指导意义。

本研究通过观察耐 GEM 的 SW1990-GZ 细胞与亲本细胞 SW1990 生长情况,发现前者的生长速度明显较后者缓慢。导致这种现象出现的机制,从 GEM 药物杀伤肿瘤细胞的机制考虑,GEM 是通过参与细胞 DNA 合成过程来达到杀死肿瘤细胞的目的。在诱导 GEM 耐药的过程中,用 GEM 间歇地处理生长期细胞,使处于 DNA 合成活跃的增殖期细胞更早受到抑制影响;不断地进行这样一种筛选,生长增殖缓慢对 GEM 敏感性差的胰腺癌细胞就被遗留下来,组成了耐 GEM 的胰腺癌细胞株。研究[4]表明,肿瘤是由异构的细胞群与肿瘤干细胞的一个小子集(两者)维持肿瘤的形成和生长。研究[5]报道,化疗药物虽然能够杀伤大部分的肿瘤细胞,但肿瘤干细胞存留下来,没有被药物杀伤,这可能是化疗药物导致肿瘤耐药的重要机制之一。亲本细胞经 GEM 药物诱导耐药后,推测由于化疗药物的长期诱导杀伤致大部分肿瘤细胞死亡,而处于化疗药物不敏感的肿瘤干细胞能在此过程中生存下来成为耐药细胞系的主生力量。研究[6]表明肿瘤干细胞长期处于休眠状态或者生长增殖缓慢状态。本研究中 GEM 耐药细胞 SW1990-GZ 较亲本细胞 SW1990 的生长速度慢,推测间歇递增浓度的 GEM 可能起到一种筛选作用,同时对化疗药物不敏感的肿瘤干细胞可能参与了此过程。

本实验显示 SW1990-GZ 细胞较其亲本细胞胞内的 GEM 药物浓度明显减少。该种耐药细胞有可

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

能存在某种缺陷使得其对 GEM 药物的摄取障碍，或者摄取 GEM 后，该种耐药细胞可能存在某种机制使得摄取进入细胞的 GEM 被快速的外排出胞；上述两种现象最终都可能导致细胞内的 GEM 浓度减少，从而影响了药物的抗肿瘤效应，产生了肿瘤细胞耐药性。

GEM 是一种前药，需要核苷酸引入细胞内，减少平衡核苷酸转运蛋白（human equilibrative nucleoside transporter，hENT1）的表达将阻断细胞对 GEM 的摄取，从而赋予 GEM 对细胞的低毒性作用。有研究[6]表明，肿瘤细胞内 hENT1 低表达的胰腺癌患者很少能从 GEM 的治疗中获益。Tanaka et al[6] 分析了 149 例局部晚期胰腺癌的转运蛋白基因多态性，结果 hENT1 低表达不仅与 GEM 化疗的Ⅲ、Ⅳ度粒细胞减少相关（$P=0.17$），而且与不佳预后有关（无进展生存期 4.2 个月 *vs* 8.3 个月）。本实验中 SW1990-GZ 细胞胞内的 GEM 摄取明显减少，推测可能与 hENT1 低表达有关。从这方面研究细胞耐药的机制，有可能纠正药物摄取缺陷，促进对细胞的药物耐受性攻克，为今后更有效的治疗胰腺癌提供一条新途径。

本实验成功诱导了 GEM 耐受的胰腺癌细胞株，耐药性能明显稳定，为进一步研究 GEM 耐药机制提供了有效的细胞模型。

参考文献

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics,2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013,63(1):11 - 30.

[2] Long J, Zhang Y, Yu X, et al. Overcoming drug resistance in pancreatic cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(7):817 - 28.

[3] Azmi A S, Bao B, Sarkar F H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review [J]. Cancer Metastasis Rev,2013,32(3 - 4):623 - 42.

[4] Hong S P, Wen J, Bang S, et al. CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells [J]. Int J Cancer, 2009, 125(10): 2323 - 31.

[5] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005,5(4):275 - 84.

[6] Tanaka M, Javle M, Dong X, et al. Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer [J]. Cancer,2010,116(22):5325 - 35.

Establishment of the human resistant pancreatic cancer cell lines SW1990/gemcitabine and its characteristics test

Jia Yifu, Ding Fei, Yu Yue, et al

(*Dept of Gastroenterology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230001)

Abstract ***Objective*** To investigate how to induce the resistant cell line SW1990/gemcitabine (GEM) for further clarify the resistant mechanisms of pancreatic cancer , and compare the characteristics between SW1990 and SW1990-GZ. ***Methods*** SW1990-GZ was derived from the human pancreatic cancer cell lines SW1990 by exposing the cells to intermittently increasing concentrations of GEM. The IC_{50}, resistance index (R), and growth difference was observed by MTT assay. Cellular intake of SW1990 and SW1990-GZ was detection by HPLC. ***Results*** The IC_{50} of SW1990 and SW1990-GZ were respectively (0.07 ± 0.002 1) μg/ml, (87.50 ± 3.240 0) μg/ml, R = 1 250; sensibility to GEM in SW1990-GZ were more lower than that in SW1990 cell in different concentration s of GEM. Growth rate of SW1990-GZ was slower than that of SW1990 from the growth curve; GEM intake in SW1990-GZ was lower than that in SW1990 in different times. ***Conclusion*** Human resistant pancreatic cancer cell lines SW1990/GEM is successfully established, and its resistant characteristics are stable and clear. SW1990-GZ maybe decrease GEM intake by some unclear pathways.

Key words human pancreatic cancer cell lines; gemcitabine resistance; establish

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net