189-192 25

BIBLID: ISSN 0253-9756 Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报 1994 Mar; 15 (2): 189—192

抗阿霉素的中国仓鼠卵巢上皮细胞系的抗药性[1]

姜 兵[2]，张鸿卿，薛绍白 （北京师范大学生物系，北京100875，中国）

R965.2

Drug resistance of doxorubicin-resistant CHO cell line[1]

JIANG Bing[2], ZHANG Hong-Qing, XUE Shao-Bai
(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

ABSTRACT Some characteristics of doxorubicin-resistant CHO cell line (RC1) were studied by means of cell biological methods and SDS-PAGE electrophoresis. The resistance factor was 16.5-fold, and RC1 revealed cross-resistances to colchicine, actinomycin and harringtonine. By indirect immunofluorescence assay, P-glycoprotein was not detected. Compared with CHO, the doxorubicin (Dox) uptake and accumulation of RC1 decreased, but the membrane fluidity of RC1 increased. The reduction in drug accumulation was correlated with increase in membrane fluidity. Dox was mainly distributed in the cell nucleus of CHO, but in both cytoplasm and nucleus of RC1. This suggested that Dox was transported more slowly in RC1 cytoplasm than in CHO cytoplasm, resulting in less Dox entrance into the cell nucleus of RC1 than into that of CHO. We also found that a 30—40 kDa nuclear protein which was expressed normally in CHO disappeared in RC1.

KEY WORDS doxorubicin; glycoproteins; membrane fluidity; drug resistance; cultured cells; CHO cells

摘要 用细胞生物学和SDS-PAGE电泳方法，研究抗阿霉素(Dox) CHO细胞系(RC1)的特性. 用间接免疫荧光法，未测到RC1超表达P-糖蛋白. RC1降低Dox的摄入，增加膜的流动性. Dox在CHO中主要分布在细胞核，在RC1中则分布在细胞质和细胞核. RC1中有一种分子质量为30—40 kDa的核蛋白的表达被抑制，而在敏感CHO中其表达正常.

关键词 阿霉素；糖蛋白类；膜流动性；抗药性；培养的细胞；中国仓鼠卵巢上皮细胞

在进行肿瘤化疗过程中，常由于抗药性而导致失败. 在体外已建立了多药抗性的细胞系，发现在抗性细胞膜上有分子质量为170—180 kDa的糖蛋白的超表达，这种蛋白被称为P-糖蛋白[1,2]. 抗药性细胞能降低药物的摄入，是由于P-糖蛋白将药泵出细胞外的缘故[2]. 我们建立多药抗性细胞系的目的是在于研究抗药性机制和寻找克服抗药性的途径. 本文简述了用Dox筛选RC1的过程，对RC1进行了一些生物学指标的检测，并对抗药性机制作了一些探讨. 虽然在RC1细胞膜上没有明显的P-糖蛋白的超表达，但我们试图找出它能降低药物积累的原因.

MATERIALS AND METHODS

Dox为Farmitalia Carlo Erba, Italy产品，用生理盐水配成1 mg·ml^{-1}母液，用0.2 μm的微孔滤膜过滤后避光贮存. 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)为Sigma产品. MRK16为P-糖蛋白的单抗，由日本藤凯矢涂若教授惠赠. FITC-羊抗兔IgG为北京生物制品所的产品. 敏感CHO细胞由本室提供，CHO和RC1都用含10%小牛血清的DMEM (Gibco公司)培养

Received 1992-07-14 Accepted 1993-06-04
[1] Project supported by the National Natural Science Foundation of China, № 39270785 and Doctor's Foundation of the National Educational Committee, № 9202702.
[2] Now in *Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China.*

基，37℃、5 % CO_2中培养.

建立抗药性细胞系的方法[2] 将CHO细胞培养在含10 %血清的DMEM培养液中，先用Dox 0.01 μg·ml^{-1}诱导培养CHO细胞3个月. 然后在3个月内逐步倍增Dox的浓度达0.1 μg·ml^{-1}. 接着进行Dox低浓度到高浓度的筛选. 随后用无菌钢圈套取抗性倍数较高的克隆RC1. 作CHO和RC1对Dox的剂量-反应曲线，求CHO和RC1的IC_{50}值，抗性倍数即为RC1的IC_{50}与CHO的IC_{50}的比值. 用同样的方法可测定RC1的交叉抗药性的倍数.

体外培养细胞体积测定和细胞周期分析 将细胞经胰蛋白酶消化后，加入5 ml的PBS: NaCl 136, KCl 2.7, Na_2HPO_4 9.7, KH_2PO_4 1.5 mmol·L^{-1}(pH 7.4)制成细胞悬液，用Coulter Counter (England)和多道分析仪测定细胞体积. 将对数生长期的细胞，以10^5 cells·ml^{-1}种入大方瓶，48 h后用胰蛋白酶消化收集细胞，70 %冷乙醇固定，RNA酶消化，碘化丙啶(PI 50 μg·ml^{-1})染色，FACS420 (B·D公司)流式细胞光度仪测定*PI*荧光值.

P-糖蛋白超表达的检测[4] 将细胞种在盖片上，用0.1 %多聚甲醛PBS (Na_3PO_4 0.02 mol·L^{-1}, NaCl 0.15 mol·L^{-1}, pH 7.4)的溶液，4℃固定30 min，用PBS洗3次，加0.2 ml McAb (20 μg蛋白) 4℃温育30 min，用PBS振荡洗3次，用0.2 ml二抗(联有FITC的羊抗兔IgG) 37℃温育30 min，用PBS振荡洗3次，以CHO细胞为阴性对照，在荧光显微镜下观察RC1，蓝光激发，细胞发绿色荧光.

Dox的摄入和在细胞内的分布[5,12] 4×10^6细胞在37℃、5 % CO_2培养箱经Dox 10 μg·ml^{-1}作用1 h. 用冰冷的PBS洗3次. 超声破碎细胞. 60 %乙醇:盐酸0.3 mol·L^{-1}(1:1)抽提细胞内的Dox，12 000×*g*离心30 min，上清液转移到比色杯，Hitachi 850荧光分光光度计测定Dox的荧光值. 测定条件：λ_{ex} = 475 nm, λ_{em} = 575 nm，狭缝10, 10 nm，加390 nm滤玻片. 细胞在含Dox 10 μmol·L^{-1}的DMEM培养液中处理15 min后，用甲醇:丙酮(1:1, vol:vol)在−20℃下固定5 min. 绿光激发，在荧光显微镜下观察Dox在细胞内的分布.

细胞膜流动性的测定[6] 用胰蛋白酶消化收集的细胞，用PBS洗2次. 加DPH 2 μmol·L^{-1}, 25℃染色30 min，PBS洗2次. 用荧光分光光度计测定荧光偏振度(P):

$$P = (Iw - G \times IvH)/(Iw + G \times IvH)$$

膜的微粘度 $\eta = 2P \times (0.46 - P)$

微粘度越小，膜流动性越大，测量条件：λ_{ex} = 362 nm, λ_{em} = 432 nm，狭缝10, 10，加390 nm滤玻片.

核蛋白的电泳[7] 用冰冷的核缓冲液：NaCl 150, KH_2PO_4 1, $MgCl_2$ 5, EGTA 1, DTT 0.1 mmol·L^{-1}刮取细胞，离心收集，在2 ml核缓冲液的细胞悬液中加入18 ml含0.3 % Triton X-100，细胞在冰上裂解10 min，500×*g*离心10 min收集核，重新用核缓冲液悬浮核，在显微镜下检查核纯度. 在提取的核中加入等量的蛋白质样品处理液，煮沸10 min，用SDS-PAGE电泳鉴定.

RESULTS

CHO为梭形，RC1明显变圆，更饱满. RC1已加药培养2年多，共传240代，抗药性状稳定，抗性倍数为16.5倍. 抗药性细胞体积增大，RC1克隆形成率略为降低，倍增时间延长(Tab 1).

Tab 1. General characteristics of CHO and RC1. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. $^aP>0.05$, $^bP<0.05$ *vs* control.

Cell line	CHO	RC1
Cell volume/μ^3	1 873.68±29.64	2 030.34±14.82^b
Plating efficiency*	79±3	75.8±2^a
Doubling time/h	16±0.4	16.5±0.6^a

* Proentage of seeded cells able to form a colony of > 50 cells.

FCM分析，RC1中的G1期细胞%增加(Tab 2).

Tab 2. Cell cycle analysis on the % duration of cell cycle phases.

Cell line	G1 % phage	S % phage	G2 % phage
CHO	36.7±4.3	14.6±10	48.7±8
RC1	53.1±5.4	11.3±8.4	35.6±6.9

RC1对秋水仙碱、放线菌素、三尖杉酯碱

交叉抗性倍数分别为4.5，11.5，10倍，是属于多药抗性的细胞系. P-糖蛋白在RC1中没有明显的超表达. 10^7个CHO细胞中Dox摄入量为1.34±0.04 μg，10^7个RC1细胞中Dox的摄入量为0.51±0.02 μg，$P<0.01$，RC1细胞中Dox的摄入降低达37 %. 抗药性细胞能显著降低所抗药物的摄入. 抗药性细胞的膜微粘度降低，膜流动性增加(Tab 3). Dox在CHO细胞中主要分布在细胞核，在RC1中则分布在细胞质和核(Fig 1).

Tab 3. Membrane fluidity in CHO and RC1. $\bar{x}\pm s$, $^tP<0.01$ *vs* control.

Cell line	*n*	P	Y
CHO	4	0.234±0.025[t]	2.12±0.48[t]
RC1	5	0.194±0.018	1.48±0.258

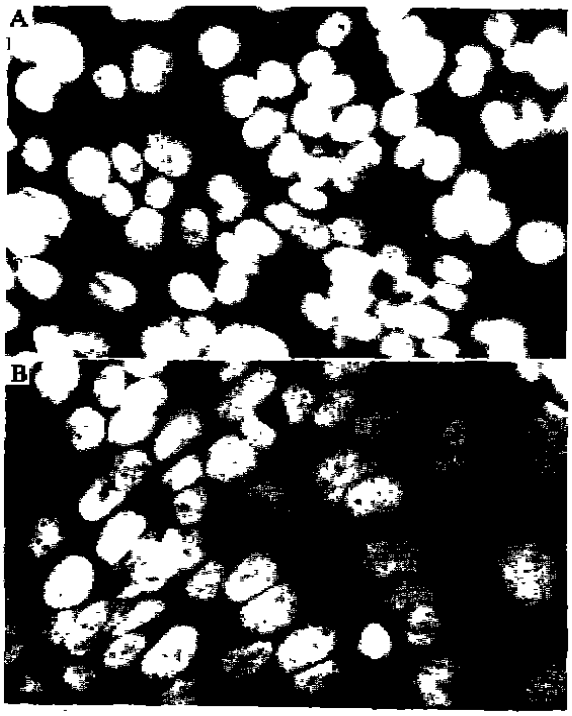

Fig 1. Doxorubicin distribution in CHO (A) and RC1 (B) under fluorescence microscope. × 400.

在核蛋白电泳中，与CHO相比抗药性细胞核中少了一条分子质量为30－40 kDa的蛋白带(Fig 2).

Fig 2. SDS-PAGE electrophoresis analysis on nuclear protein of (A) CHO cells; (B) nuclei isolated from CHO; (C) RC1 cells; (D) nuclei isolated from RC1.

DISCUSSION

Bech-Hansen 等[8]用秋水仙碱逐步筛选CHO细胞，用诱变剂增加基因发生突变或扩增的频率，获得高抗性倍数的细胞株，为了使体外抗药性细胞系更接近体内肿瘤产生抗药性的过程，我们在筛选过程中没有使用诱变剂. Baas[9]等曾用Dox筛选出人类鳞状肺癌细胞抗药株SW-1573/50和SW-1573/1000，SW-1573/50表现低倍抗药性，SW-1573/1000表现高倍抗药性，它们都表现交叉抗药性. 但从SW-1573/50难以检测到mdrl转录产物和P-糖蛋白，SW-1573/1000不但能检测到mdrl的mRNA和P-糖蛋白的超表达，还能检测到mdrl基因的扩增. 非P-糖蛋白介导的多药抗性的发生早于P-糖蛋白的表达. 我们的RC1，类似于SW-1573/50，这可能由于RC1的抗性倍数不高. 多药抗性细胞并非都表达P-糖蛋白[10]，如用ACT-D，VCR筛出CHL抗药株，在细胞表面有分子量为100 kDa的糖蛋白表达量的降低. 在我们实验中，分子质量为30－40 kDa的核蛋白在敏感CHO中表达正常，在RC1中表达被抑制，与文献[10]类似. 由于Dox作用于DNA，提示抗药性细胞受它的长期诱变后，可能导致某些基因的表达量降低或丧

失.

多药抗性的机制相当复杂，有许多现象不能用 P-糖蛋白超表达来解释. 在 RC1中没有发现有 P-糖蛋白超表达，但发现 RC1摄入 Dox 量降低，这可能与抗药性细胞的膜流动性增加有关. May 等[11] 报道在抗长春花碱的人白血病淋巴细胞抗性株脂类某些成分发生变化，这可能于膜的通透性变化有关，并与多药抗性有关. RC1膜的流动性增加，可能与它的膜脂成份发生变化有关，致使 Dox 的摄入量降低. Dox 在 CHO、RC1中主要分布与文献[12]相符，推测由于在抗药性细胞质中发生某种变化，使 Dox 在 RC1细胞质中的运输速度减慢，最终导致进入细胞核的 Dox 量降低，致使 Dox 对 RC1的毒性降低.

REFERENCES

1 Riordan JR, Ling V. Purification of P-glycoprotein from plamsa membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. J Biol Chem 1979; **254**: 12701－5.

2 Kartner N, Shales M, Riordan JR, Ling V. Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. Cancer Res 1983; **43**: 4413－9.

3 Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. Cancer Res 1970; **30**: 1174－84.

4 FitzGerald DJ, Willingham MC, Cardarelli CO, Hamada H, Tsuruo T, Gottesman MM, *et al*. A monoclonal antibody-*Pseudomonas* toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987; **84**: 4288－92.

5 Harker WG, Sikic BI. Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA. Cancer Res 1985; **45**: 4091－6.

6 Lin KC, Nie SQ, Bo HQ, Jiao YL. Research on membrane fluidity of Ascites cells with fluorescence probe DPH. Prog Biochem Biophys 1981; **6**: 32－5.

7 Bellamy WT, Dorr RT, Dalton WS, Alberts DS. Direct relation of DNA lesions in multidrug-resistant human myeloma cells to intra-cellular doxorubicin concentration. Cancer Res 1988; **48**: 6360－4.

8 Bech-Hansen NT, Till JE, Ling V. Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. J Cell Physiol 1975; **88**: 23－32.

9 Baas F, Jongsma APM, Broxterman HJ, Arceci RJ, Housman D, Scheffer GL, *et al*. Non-P-glycoprotein mediated mechanism for multidrug resistance precedes P-glycoprotein expression during *in vitro* selection for doxorubicin resistance in a human lung cancer cell line. Cancer Res 1990; **50**: 5392－8.

10 Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. Biochim Biophys Acta 1988; **948**: 87－128.

11 May GL, Wright LC, Dyne M, Mackinnon WB, Fox RM, MountFord CE. Plasma membrane lipid composition of vinblastine sensitive and resistant human leukaemic lymphoblasts. Int J Cancer 1988; **42**: 728－33.

12 Keizer HG, Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Lankelma J, Schoonen WGEJ, Van Rijn J, *et al*. Correlation of multidrug resistance with decreased drug accumulation, altered subcellular drug distribution, and increased P-glycoprotein expression in cultured SW-1573 human lung tumor cells. Cancer Res 1989; **49**: 2988－93.

书 讯

由秦伯益、李 珏教授主编的《麻醉性高效镇痛药盐酸二氢埃托啡临床应用典型病例集》近日已由中国科学技术出版社出版. 本书汇集了临床应用盐酸埃托啡的典型病例115例，是一部实用性、知识性强的临床工具手册. 订价4.00元. 需者请汇款至北京市海淀区太平路48号军事医学科学院情报研究所印刷厂刘建华收(邮编100850).