

氟尿嘧啶耐药人体胃癌细胞株的特性及形态表现

乐秀芳, 韩家娴, 戴志强, 刘明章, 杨蔚怡, 许建一, 周建军, 陈陵际, 张素胤
中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

Characterization of a fluorouracil-resistant human gastric carcinoma cell line and its morphological behavior

LE Xiu-Fang, HAN Jia-Xian, DAI Zhi-Qiang, LIU Ming-Zhang, YANG Wei-Yi, XU Jian-Yi, ZHOU Jian-Jun, CHEN Ling-Ji, ZHANG Su-Yin
Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT A fluorouracil (FU)-resistant human gastric carcinoma cell line (SGC-7901/R) was established in vitro by progressively increasing the concentration of FU from $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ to $2.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. The cell line has been successfully subcultured for more than 150 passages during more than 2 years. Its degree of FU resistance was 139-fold *vs* that of FU sensitive cell line (SGC-7901/S), and the resistant phenotype was stable when cells were cultured for 23 passages in FU-free medium. The doubling time was 17.3 and 25.6 h for resistant cells and parental cells, respectively.

Swiss (nu/nu) nude mice were used for the *in vivo* experiment, the FU-resistant cell line also exhibited resistance to FU and cross-resistance to mitomycin C. FU inhibited markedly the incorporation of $[^3\text{H}]\text{UR}$ into DNA of sensitive cells and only showed a 31.6% inhibition in resistant cells. For the incorporation of $[^3\text{H}]\text{TdR}$ into DNA, inhibitory rates were seen with different concentrations of FU in resistant cells.

By morphologic observation, SGC-7901/R cells showed little secretion but without any tendency to form nodular pattern. Their nuclei were allotypic with enlarged perinuclear space and a few intranuclear pseudoinclusions. The mitotic phase of cells was found frequently. The phenotype of resistant cell line can be deduced more malignant than that of parental cell line.

KEY WORDS fluorouracil; stomach neoplasms; cultured tumor cells; drug resistance; nude mice

摘要 FU 耐药人体胃癌细胞株耐药程度(IC_{50})与耐药前敏感细胞株比,相差 139 倍,且耐药性稳定。细胞耐药后分裂更为旺盛,能在裸鼠皮下生长,并对 FU 也显示抗药性, FU 明显抑制敏感细胞 RNA 的合成,对耐药细胞在 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时才显示一些作用,而 FU 对耐药细胞 DNA 合成在不同剂量下均有 40% 左右的抑制作用。形态观察显示耐药细胞株较敏感株分化更差,恶性程度增加。

关键词 氟尿嘧啶; 胃肿瘤; 培养的肿瘤细胞; 耐药性; 裸小鼠

FU 是治疗消化道肿瘤的有效抗癌药,临床长期用药可产生抗药性早有报道^[1]。肿瘤细胞对化疗药物产生抗药性是癌症治疗失败重要因素之一,为此建立了一株对 FU 耐药的人体胃癌细胞株,观察其生物学特性,为克服耐药形成及寻找无交叉耐药的化合物提供依据。本文观察 FU 耐药细胞株的生长特性,耐药程度,形态特征,并与敏感细胞株进行比较;对其耐药产生的机理也作初步探讨。

MATERIALS AND METHODS

氟尿嘧啶 (fluorouracil, FU) 上海海普药厂生产,批号为 9101501,丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 日本协和发酵工业株式会社生产。噻唑蓝 (MTT) Sigma 产品。 $[^3\text{H}]\text{TdR}$, $[^3\text{H}]\text{UR}$ 由中国科学院上海原子核研究所提供,比活性分别为 0.62 和 $0.5 \text{ PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$,用生理盐水稀释,每实验样品加入量为 $185 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

实验用 SGC-7901 人体胃癌细胞株^[2]即对 FU 敏感细胞株 (SGC-7901/S) 及由我组建立对 FU 耐药人体胃癌细胞株 (SGC-7901/R) 均培养于 RPMI 1640 (Gibco) 培液中,内含 10% 小牛血清,青霉素 $100 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

实验用 Swiss-nu/nu 裸小鼠由我所实验动物研究室提供, 鼠龄 6—8 wk.

细胞生长试验 取对数生长期 SGC-7901/S 和 SGC-7901/R 细胞, 按不同细胞浓度分别接种于 40 孔微量培养板内, 在 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养. 接种后不同天数, 分别进行活细胞计数, 计算细胞生长倍增时间.

细胞生长抑制试验 本实验采用 MTT 法^(3,4) 进行. 细胞接种后, 加入不同浓度 FU, 对照孔加入等量生理盐水, 药物作用 48 h, 结束培养前 3 h 加入 MTT 溶液, 再温育 4—5 h 后加入以 HCl 12 mmol · L⁻¹ 配制的 10% SDS-5% 异丁醇溶液, 用酶联仪以 570 nm 波长进行测定, 计算抑制细胞生长达 50% 时的 FU 浓度, 以 IC₅₀ 值表示之.

体内试验 SGC-7901/S 和 SGC-7901/R 细胞先接种于裸小鼠皮下, 待生长成实体瘤后再剪成 2—3 mm³ 小瘤块, 接种于裸小鼠腋部皮下, 接种后 d 2 ip 给药, 每周 1 次, 共 4 次. 停药后 1 周解剖, 称瘤重, 与对照相比, 计算肿瘤抑制率, 评价疗效. 本实验用 MMC 作为阳性对照.

³H 参入试验 以 ³H 标记前体参入法⁽⁵⁾ 观察 FU 对 SGC-7901/S 和 SGC-7901/R 细胞 DNA, RNA 合成的影响. 接种细胞后加入不同浓度 FU, 对照组加入等量生理盐水, 药物作用 48 h. 收集细胞前 1 h 分别加入 [³H]TdR 和 [³H]UR, 收集的细胞加入冰冷 TCA 使其最终浓度为 10%. 通过减压抽滤, 酸沉淀大分子集中于玻璃纤维膜上. 用冷 5% TCA 及乙醇洗涤数次, 最后以液体闪烁仪测定其 dpm 值.

光镜(OM)样品的制备和观察 剖取 SGC-7901/S 和 SGC-7901/R 的裸小鼠移植瘤, 置于 10% 福尔马林溶液内固定, 而后常规石蜡包埋, 切片, 经 HE 染色后摄片.

透射电镜(TEM)样品制备与观察 将贴壁生长的 SGC-7901/S 和 SGC-7901/R 细胞制成悬液, 离心成团后分别用 2.5% 戊二醛作前固定, 1% 酸作后固定, 丙酮系列浓度脱水, 环氧树脂 618 包埋, 超薄切片, 经醋酸铀, 枸橼酸铅双重染色后摄片. 制备裸小鼠移植瘤样品时, 将瘤组织分割成 1 mm³ 左右, 作固定、脱水、包埋、切片、染色等, 方法同上.

扫描电镜(SEM)样品制备与观察 将培养在盖玻片上的 SGC-7901/S 和 SGC-7901/R 细胞分别按上法固定, 乙醇系列浓度脱水, 醋酸异戊酯置换, 经临界点

干燥仪干燥, 离子溅射仪涂金后摄片.

RESULTS

耐药程度及稳定性观察 SGC-7901/S 细胞长期与 FU 共同温育, 传代培养, 开始 FU 浓度为 50 ng · ml⁻¹, 以后逐渐递增至 2.5 mg · ml⁻¹, 在此药物浓度下, 细胞仍能良好生长, 分裂繁殖. 至今已传至 150 代, 为 SGC-7901/R 细胞. 本实验采用 MTT 法观察 FU 对上述 2 细胞株的作用(Tab 1), 两者 IC₅₀ 之值相差 139 倍, 显示敏感细胞已对 FU 产生明显抗药性. 此耐药细胞如果在无 FU 存在下继续传代培养 23 代, 与敏感株相比 IC₅₀ 值仍大于 100 倍, 继续保持对 FU 的抗药性.

Tab 1. Sensitivity to FU of FU-resistant and parental cell line.

Sublines	IC ₅₀ (95% CL) (μg · ml ⁻¹)	Resistance factor = R/S
Sensitive	14.4 (10.4—20.0)	
Resistant	1 996 (690—5 774)	139
Resistant*	1 810 (851—3 848)	126

* After 23 passages in FU-free medium.

细胞生长特性观察 实验分别用 3 种不同细胞浓度进行接种, 观察其生长速率. 从 Fig 1 可见 SGC-7901/R 细胞生长较快, 其倍增时间为 17.3 ± 1.2 h, 而 SGC-7901/S 细胞倍增时间为 25.6 ± 2.5 h. 说明细胞耐药后其生长繁殖更为迅速.

体内耐药性研究 接种 SGC-7901/S 的裸小鼠经 FU (60 mg · kg⁻¹) 或 MMC (2 mg · kg⁻¹) 治疗后, 2 组肿瘤抑制率分别为 42.2% 及 45.6%, P 值均小于 0.05. 而接种 SGC-7901/R 的裸小鼠, 用相同剂量和给药方案治疗时, FU 组及 MMC 组的平均瘤重均大于对照组的瘤重(Tab 2). 结果表明体外建立的对 FU 耐药人体胃癌细胞株, 经体内试验也证实对 FU 产生明显抗药性. 实验也提示其

对 MMC 具有交叉耐药性。

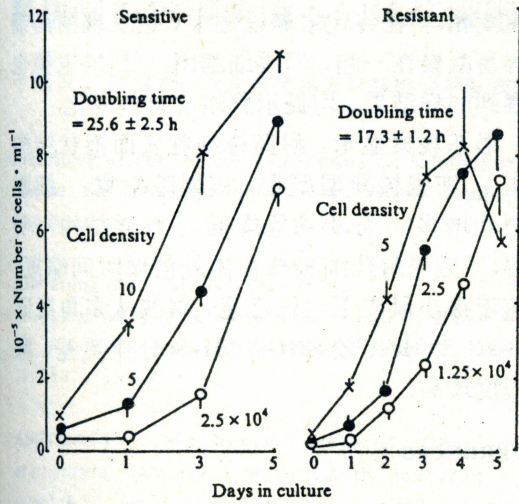


Fig 1. Growth characteristics of SGC-7901 cells. n=4, $\bar{x} \pm s$.

³H 前体参入研究 FU 对 UR 参入敏感细胞株 RNA 有明显抑制作用, FU 0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时抑制率达 47.8%, 随着 FU 浓度增加, 抑制率也相应递增, 而对耐药细胞株, 只有当 FU 剂量高达 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 才显示 31.6% 的抑制作用 (Tab 3).

FU 对 TdR 参入 DNA 的影响, 在敏感细胞株当 FU 的浓度为 20, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 其抑制作用分别为 49% 和 77.5%. 而对耐药细胞株, 在不同 FU 浓度下, 其抑制率相似。

体外培养 SGC-7901/S 与 SGC-7901/R 细胞的形态学比较 在 TEM 下, 细胞株的主要差别表现为耐药株细胞核异型性更典型, 核内假包涵体多见, 胞浆中线粒体严重肿胀, 内嵴几近消失, 髓样结构和其他次级溶酶体增多, 粘液泡偶见 (Fig 2, Plate 1).

Tab 2. Effect of FU on nude mice bearing SGC-7901/S and SGC-7901/R cells. FU and mitomycin C (MMC) ip once a wk for 4 wk, $\bar{x} \pm s$. ^bP<0.05 vs control.

Cell line	Drug	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Number of mice Treated/Control	Tumor wt (g) Treated/Control	Inhibition rate (%)
SGC-7901/S	FU	60	4/7	0.48±0.02/0.83±0.28	42.2 ^b
	MMC	2	4/7	0.45±0.29/0.83±0.28	45.6 ^b
SGC-7901/R	FU	60	4/5	2.3±1.6 / 1.9±0.6	0
	MMC	2	4/5	2.1±0.5 / 1.9±0.6	0

Tab 3. Effects of FU on synthesis of macromolecules in SGC-7901 cells. n=3-4, $\bar{x} \pm s$. ^aP>0.05, ^bP<0.05, ^cP<0.01 vs saline.

Precursor incorporation	Concn $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	SGC-7901/Sensitive		SGC-7901/Resistant	
		dpm	Inhibition %	dpm	Inhibition %
³ H]UR into RNA	Saline	1 505±349		132 003±21 304	
	0.8	785±19	47.8 ^b	141 481±20 252	0
	4	710±83	52.8 ^b	132 664±34 718	0
	20	345±26	77.1 ^c	142 953±11 639	0
	100	219±18	85.4 ^c	90 317±12 946	31.6 ^b
³ H]TdR into DNA	Saline	7 032±1 283		5 078±1 323	
	4	7 167±3 977	0	2 876±652	43.3 ^b
	20	3 583±1 410	49.0 ^a	2 661±471	47.5 ^b
	100	1 576±534	77.5 ^c	2 992±443	41.0 ^b

在 SEM 下,与敏感株相比,SGC-7901/R 细胞在不同增殖周期其表面微绒毛更为丰富,胞厚实,丝状伪足较多且较长,片状伪足少见,细胞核不明显,细胞表面也无查见泡状结构,常见成堆细胞,有明显聚集倾向(Fig 3, Plate 2).

SGC-7901/S 和 SGC-7901/R 细胞移植裸小鼠皮下生长瘤的形态观察 在 OM 下,SGC-7901/S 癌细胞结构杂乱,偶而可见类似腺样排列.核深染,双核细胞较多,有些核呈出芽状、鱼钩状.有相当多癌细胞的胞浆分泌物多而明显,癌细胞间质局部可见退行性变(Fig 4, Plate 3).与前者相比 SGC-7901/R 的癌组织结构更为杂乱,看不到类似腺体样集结的趋向.核呈异形性,更不规则,且分裂相增多,核质着色较淡.胞浆有分泌物的癌细胞较少,且不明显(Fig 4, Plate 3).

经 TEM 观察,SGC-7901/R 细胞核异形性也更典型,内质网均严重扩张,核周隙增宽,胞浆中细胞器减少,线粒体严重空泡化,张力纤维束未查见(Fig 5, Plate 4).

DISCUSSION

建立的对 FU 耐药人体骨癌细胞株经体内、体外实验均显示其对 FU 有明显抗药性.³H 前体参入研究显示 FU 对 UR 参入敏感细胞株 RNA 在低浓度时即有 50%左右抑制作用.而对耐药细胞株,只有当 FU 浓度增加 100 倍时才显示的 30%的抑制率.这可能是由于细胞产生抗药性的机制之一.

FU 对 TdR 参入 DNA 的作用,在耐药细胞株以不同浓度 FU 作用时,其抑制率相似,均在 40%左右,这是否耐药细胞株显示特性,对 DNA 作用无量-效关系,有待研究.关于 FU 耐药产生机制与 DNA 的关系,认为与胸苷激酶(thymidine kinase)活性升高^[6],以及 FU 本身活化异常有关.因 FU 对 DNA 合成的抑制作用,需在体内经过一系列反应变成氟尿嘧啶脱氧核苷酸才起作用^[7,8].

耐药细胞株内^{[3}H]UR 的放射性明显高于敏感细胞株,提示耐药后细胞膜的通透性可能发生变化.在传代培养过程中,也发现耐药细胞容易凝聚在一起,形成细胞团.扫描电镜也观察到同样结果,均提示膜组成有些变化.

形态观察显示,耐药株细胞表面泡状结构消失.细胞核异型严重,核周隙增宽.细胞分裂相增多.分泌功能降低.腺样结构不明显等.另外耐药细胞株在体外倍增时间缩短.移植于裸小鼠皮下生长迅速,这些从多角度证实 SGC-7901/R 较 SGC-7901/S 分化更差,恶性程度增高.

REFERENCES

- 1 Bertino JR. Resistance of human tumors to cancer chemotherapeutic agents; an important research problem. *Med Pediatr Oncol* 1978; **5** : 105-14.
- 2 Yang JL, Shen ZM, Han JX. A study on the biological characteristics of an established human gastric adenocarcinoma cell line (SGC-7901). *Kexue Tongbao* 1982; **27** : 1355-8.
- 3 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65** : 55-63.
- 4 Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; **47** : 936-42.
- 5 Burrens NS, Clement JJ. Antitumor activity and mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide-A and -B and onnamide. *Cancer Res* 1989; **49** : 2935-40.
- 6 Tezuka M, Sugiyama H, Tamemasa O, Inaba M. Biochemical characteristics of a 5-fluorouracil-resistant subline of P388 leukemia. *Gann* 1982; **73** : 70-6.
- 7 Washtien WL. Comparison of 5-fluorouracil metabolism in two human gastrointestinal tumor cell lines. *Cancer Res* 1984; **44** : 909-44.
- 8 Peters GJ, Laurensse E, Leyva A, Lankelma J, Pinedo HM. Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 1986; **46** : 20-8.