

人多发性骨髓瘤耐药细胞系 MOL P-2/ R 的建立及其耐药机制

肖 晖,张克俭,左学兰

Establishment of Melphalan-resistant Multiple Myeloma Cell Line MOL P-2/ R and Its Multidrug Resistant Mechanisms

XIAO Hui, ZHANG Ke-jian, ZUO Xue-lan

Department of Hematology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract :Objective To establish melphalan-resistant cell line of human multiple myeloma MOL P-2/ R and to investigate its biological characteristics and possible mechanisms of acquired resistance. **Methods** Melphalan-resistant cell line of multiple myeloma MOL P-2/ R was established by continuous stepwise selection in increasing concentration of melphalan. Cell morphology, growth curve and population doubling time, protein level of P-gp, MRP and FANCD2 monoubiquitination were investigated to determine the biological features of MOL P-2/ R cell line. The IC_{50} and resistance index (RI) were measured by MTT assay. **Results** A melphalan-resistant cell line MOL P-2/ R was successfully established. The resistance index (RI) of MOL P-2/ R cells was up to 6.03. Besides melphalan it was cross resistant to many other chemotherapeutic agents, such as ADM, CTX, DDP and VP-16. Comparing with its parent cell line, the multiplication time was postponed ($P < 0.05$), but the proportion of S phase wasn't significantly higher than parent cell line ($P > 0.05$). Western blot studies showed that the levels of P-gp, MRP expression in the MOL P-2/ R cells were similar with the sensitive cells, but enhanced FANCD2 protein monoubiquitination. **Conclusion** MOL P-2/ R cell line with stable melphalan-resistance shows typical multidrug resistance phenotypes and may serve as an ideal model for exploring the mechanism of MDR and the new route of reversing multidrug resistance. Over-expression of FANCD2 protein monoubiquitination might contribute to acquired drug resistance in MOL P-2/ R.

Key words : Multiple myeloma; Melphalan; FA/BRCA (Fanconi anemia/BRCA) pathway; Drug resistance; Multiple

摘 要 :目的 建立耐马法兰的人多发性骨髓瘤细胞系 MOL P-2/ R, 并对其生物学特性及耐药机制进行初步探讨。方法 采用马法兰浓度梯度递增法, 建立耐马法兰多发性骨髓瘤细胞系。检测两种细胞的形态差异、生长曲线及倍增时间; 用药物敏感试验检测两种细胞对马法兰及多种化疗药物的半数抑制浓度 (IC_{50}) 和耐药指数 (RI); 使用 Western blot 比较两种细胞 P-gp、MRP 和 FANCD2 的表达差异来探讨可能的耐药机制。结果 成功建立了耐药指数为 6.03 的 MOL P-2/ R 耐药细胞系, 与 MOL P-2 细胞相比, MOL P-2/ R 耐药细胞异形明显; 耐药细胞倍增时间显著延长 ($P < 0.05$); MOL P-2/ R 且对 ADM、CTX、DDP、VP-16 有交叉耐药; MOL P-2/ R 中 FANCD2 的单泛素化表达较 MOL P-2 明显增加, 而 P-gp、MRP 在耐药细胞系中表达无升高。结论 MOL P-2/ R 具有典型多药耐药特性, 为进一步研究耐药逆转途径提供了实验基础。FANCD2 蛋白单泛素化表达增强可能是 MOL P-2/ R 细胞产生获得性耐药的主要机制之一。

关键词 : 多发性骨髓瘤; 马法兰; FA/BRCA (Fanconi anemia/BRCA) 途径; 耐药性; 多药

中图分类号: R733.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2008) 12-0845-04

0 引言

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种浆细胞恶性疾病, 临床上将马法兰作为对 MM 一线

治疗方案一直沿用至今, 大多数 MM 患者在治疗初期对药物有较好反应, 但最终都将因获得性耐药而复发。MM 细胞多药耐药是导致 MM 治疗失败的主要原因。近来有研究发现 MM 细胞耐药与 DNA 损伤修复密切相关^[1-2]。但其具体机制及发生耐药途径仍不明确。建立理想的 MM 耐药细胞模型是深入研究 MM 细胞多药耐药机制的前提。我们采

收稿日期: 2008-07-23; 修回日期: 2008-08-20

作者单位: 430071 武汉大学中南医院血液内科

作者简介: 肖晖 (1975-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事临床血液学和肿瘤学研究。

用浓度梯度递增法,建立了人 MM 马法兰耐药细胞系 MOLP-2/R,并对其生物学性状进行检测和鉴定,初步探索 FA/BRCA 途径中关键蛋白 FANCD2 单泛素化表达水平在耐药细胞系中的意义。

1 材料与方 法

1.1 药物和试剂

RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。抗 FANCD2 及 α -actin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。马法兰、顺铂 (Cisplatin, DDP)、硫酸长春新碱 (Vincristine, VCR)、MTT 均购自 Sigma 公司。阿霉素 (Adriamycin, ADM)、阿糖胞苷 (Ara-c) 购自浙江海正药业有限公司。环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX)、足叶乙甙 (VP-16) 购自江苏恒瑞药业有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 诱导建立耐药细胞系

人多发性骨髓瘤细胞系 MOLP-2 购自德国微生物及细胞培养中心 (DSMZ),在 37^o、5%CO₂ 条件下,用含 10% 胎牛血清、4nmol/L 左旋谷氨酸、1% 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养液传代培养。采用逐渐增加 MOLP-2 细胞培养液中马法兰浓度的方法诱导建立耐药细胞系。马法兰在耐药细胞培养液中起始浓度为 0.25 μ mol/L,每 2 周时间增加浓度 0.25 μ mol/L,体外连续培养细胞 40 周后获得的马法兰耐药细胞系,马法兰在耐药细胞培养液中终浓度为 5 μ mol/L。将此耐药细胞系命名为 MOLP-2/R。以正常人原始淋巴细胞系 HSC93 及来自于已知范可尼贫血-F 型 (Fanconi anemia-F, FA-F) 患者的原始淋巴细胞系 VU698 作为实验对照^[3],以上两种细胞系由荷兰自由大学 Joenje 教授惠赠,培养方法同 MOLP-2 细胞系。

1.2.2 细胞形态学观察

取对数生长期的细胞,以 5 $\times 10^5$ /ml 浓度细胞涂片后,进行 Giemsa 染色,观察细胞形态结构。取对数生长期的亲代细胞 MOLP-2 和耐药细胞 MOLP-2/R,在透射电镜下观察细胞超微结构。

1.2.3 细胞生长曲线和群体倍增时间 (TD) 的测定

以细胞密度 2 $\times 10^4$ /ml 接种在 24 孔细胞培养板中,每孔 1 ml,置 37^o、5%CO₂ 温箱中培养,连续 7 d,每天计数 3 孔细胞,取均值。绘制细胞生长曲线,按 Patterson 公式,计算细胞在对数生长期的 TD = Tlg2/ lg (N/ N₀), T 为培养时间, N 为该时刻的细胞数, N₀ 为起始细胞数。

1.2.4 药敏实验

用 MTT 法检测 MOLP-2 和 MOLP-2/R 细胞对马法兰、ADM、VCR、CTX、Ara-c、VP-16 及 DDP 的敏感性。实验前两周 MOLP-2/R 细胞在不含马法兰的培养液中培养后备用。取对数生长期的 MOLP-2 和 MOLP-2/R 细胞,用 RPMI1640 培养液制成单细胞悬液,接种到 96 孔板 (细胞浓度为每孔 2 $\times 10^4$),48 h 后分别加入不同浓度化疗药物,每一浓度平行 3 孔。培养 48 h 后弃去上清液,每孔加 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μ l,继续培养 4 h 后小心弃去上清液,每孔加 200 μ l DMSO,避光振荡 10 min 使结晶物充分溶解。用酶标仪测 570 nm 波长各孔吸光度 OD 值,对照孔为不含血清的 RPMI 1640 培养液。以药物浓度为横轴,细胞存活率为纵轴,绘制浓度-效应曲线,确定半数抑制浓度 (IC₅₀),计算耐药指数 (RI) = 耐药细胞 IC₅₀/ 亲代细胞 IC₅₀。

1.2.5 细胞周期分布及 DNA 含量测定

取对数生长期的亲代细胞和耐药细胞 1 $\times 10^6$ 个 PBS 清洗。制备单细胞悬液,322 g (1 200 r/min) 离心 5 min,弃上清。重新悬浮于 2 ml 染色液 (0.15 mol/L NaCl; 0.1 mol/L Tris/HCl; 0.5 mmol/L MgCl₂; 1.0 mmol/L CaCl₂; 0.1% Igepal; 0.002% BSA) 室温孵育 15 min。加入 20 μ l 的 Hoechst stock (1 mg/ml) 4^o 孵育至少 15 min 后在流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 上进行细胞周期分析。

1.2.6 P-gp、MRP 及 FANCD2 表达的测定

采用 Western blot 方法。取对数生长期的细胞,加入 RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay, 美国 Pierce) 裂解液。冰上静置 10min 后,以 4^o、20 800 g (14 000 r/min) 离心 10 min 后取上清。采用 BCA 法 (BCA protein assay reagent kit, 美国 Pierce) 进行蛋白定量后,蛋白样品加入等体积的 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液混匀,置于沸水浴中加热 10min。蛋白样品 (每孔上样量均为 20 μ g 总蛋白) 于 SDS-PAGE 凝胶 (3% ~ 8% Tris-acetate gradient gel, Invitrogen 公司产品) 进行电泳分离,分离的蛋白条带转移至 PVD 膜并分别与抗人 P-gp、MRP、FANCD2 及 α -actin 的第一抗体于 4^o 孵育过夜后,再与辣根过氧化物酶标记的第二抗体反应,并用 ECL Western blot 分析系统 (Amersham Pharmacia Biotech 公司产品) 检测并显影。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件包,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学方法采用两样本均数比较的 *t* 检验, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长曲线和群体倍增时间的测定

细胞生长曲线显示, MOLP-2 和 MOLP-2/R 在 6~7 天达到峰值, TD 分别为 (32.9 ± 2.6)、(48.7 ± 3.1)h, 耐药细胞倍增时间比亲代细胞延长了 44.5%, MOLP-2/R 生长增殖明显减慢 (P < 0.05)。MOLP-2 和 MOLP-2/R 的生长曲线见图 1。

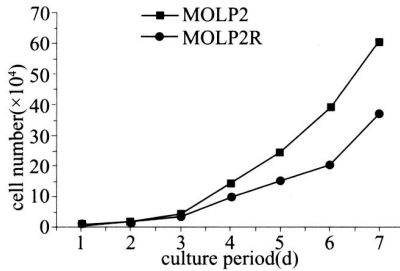


图 1 MOLP-2 和 MOLP-2/R 细胞的生长曲线

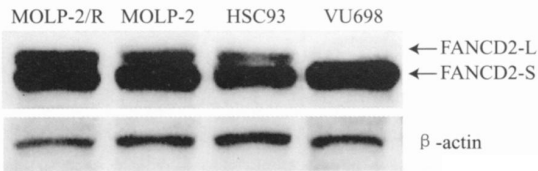
Fig 1 Growth curve of MOLP-2 and MOLP-2/R cell lines

2.2 细胞的形态学观察

耐药细胞体积大小不一致,形态不规则,胞浆较丰富,核小而不规则,可见巨核现象,伪足及胞浆中黑色颗粒增多明显;而亲代细胞呈圆形,大小一致,核圆形,胞浆清亮,分布均匀。

2.3 P-gp、MRP 及 FANCD2 的表达

P-gp、MRP 在亲代细胞和耐药细胞中均为阴性表达,提示耐药细胞的耐药发生机制与 P-gp、MRP 的高表达无关。FANCD2 单泛素化在耐药细胞中表达明显增强,提示这种耐药性的发生可能与 FA/BRCA 途径活性增强相关,见图 2。



HSC93: wild type with FANCD2 monoubiquitination (two forms including FANCD2-S and FANCD2-L); VU698: FA-F, FANCD2 monoubiquitination negative control (only with FANCD2-S form)

图 2 MOLP-2 和 MOLP-2/R 细胞中 FANCD2 单泛素化表达水平

Fig 2 FANCD2 monoubiquitination expression in MOLP-2 and MOLP-2/R cell lines

2.4 细胞周期检测

因为 FANCD2 单泛素化主要发生于 G₁~S 期,我们用流式细胞仪检测 MOLP-2/R 细胞是否阻滞于 G₁-S 期来寻求这种 FANCD2 单泛素化表达增强的原因。流式细胞仪检测细胞周期 G₁、S、G₂/M 期细胞,发现 MOLP-2/R 与 MOLP-2 细胞相比, G₁~S 期耐药细胞比例高于亲代细胞,但差异无统计学意义 (P > 0.05),见表 1。

~S 期耐药细胞比例高于亲代细胞,但差异无统计学意义 (P > 0.05),见表 1。

表 1 MOLP-2 和 MOLP-2/R 细胞周期的比较 (%)
Tab 1 Comparison of cell cycles of MOLP-2 and MOLP-2/R cell lines (%)

Cell cycle	MOLP-2	MOLP-2/R
G ₁	62.1 ± 0.79	64.7 ± 0.71
S	23.9 ± 1.36	28.0 ± 0.42
G ₂ /M	14.0 ± 0.75	7.3 ± 0.38

2.5 MOLP-2/R 的 RI 及其交叉耐药情况

除对马法兰耐药外,还对 ADM、CTX、DDP、VP-16 有交叉耐药,而对 Ara-c、VCR 无交叉耐药性,仍保持与亲代细胞相似的敏感性,见表 2。MOLP-2/R 在不含马法兰的培养液中反复传代培养 10 周后耐药性稳定, RI 为 6.01。12 周后测耐药指数降为 5.35,需重新加入 5 μmol/L 的马法兰培养,仍获得相同的耐药性,测耐药指数为 6.07。

表 2 MOLP-2/R 细胞耐药谱 (μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Cross-resistance patterns of MOLP-2 and MOLP-2/R cell lines to various chemotherapeutic agents (μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Agent	MOLP-2 IC ₅₀	MOLP-2/R IC ₅₀	RI
Melphalan	7.55 ± 0.38	44.5 ± 0.26	6.03
ADM	0.69 ± 0.13	2.45 ± 0.04	3.51
VCR	2.20 ± 0.89	2.14 ± 0.75	0.97
CTX	0.83 ± 0.01	5.87 ± 0.02	6.94
Ara-c	2.54 ± 0.06	1.08 ± 0.16	0.42
VP-16	0.06 ± 0.002	0.11 ± 0.003	1.75
DDP	0.92 ± 0.20	2.65 ± 0.09	2.83

3 讨论

诱导耐药的过程实际上也是一个筛选细胞的过程,由于细胞具有异质性,大部分敏感细胞被杀死,少数不敏感细胞存活下来并得以扩增。本实验采用在培养液中渐进式给药法,在体外采用马法兰诱导培养人多发性骨髓瘤细胞系 MOLP-2。建立了 MOLP-2 耐药细胞系,对马法兰的相对耐受度较亲代细胞提高了 6.03 倍,与亲代细胞相比,耐药细胞生长速度减慢,细胞体积无明显变化,是一种继发性耐药细胞系,具有多药耐药特性,对 CTX、ADM、DDP 等结构及作用机制不同的多种化疗药物存在不同程度交叉耐药,对 Ara-c、VCR 无交叉耐药现象。一般认为耐药指数小于 5 为低度耐药,耐药指数 5~15 为中度耐药,耐药指数大于 15 为高度耐药^[4]。这说明本研究建立了中度耐药的 MOLP-2/R 多药耐药细胞系,是研究马法兰耐药机制及筛选

逆转剂的理想模型。

研究表明,多种途径参与 MDR 的发生,包括一些细胞内因子,如 TNF、IL-2 等增强 DNA 的修复作用^[5-6]及 DNA 异常修复引起的 MDR^[7]。已发现 FA/BRCA (Fanconi anemia/BRCA) 途径在 DNA 损伤修复过程中起重要作用^[8-9],多种 FA 基因编码的蛋白通过共同的机制 FA/BRCA (Fanconi anemia/BRCA) 途径维持细胞基因组的稳定,至少八种 FA 蛋白(A, B, C, E, F, G, L 和 M)相互作用组成一个 FA 蛋白核心复合物,该复合物通过促进 FANCD2 单泛素化来激活 FANCD2,活化的 FANCD2 在 FA 复合物下游发挥作用。多种 DNA 交联剂通过该途径发挥效应,已证实在卵巢癌中 DDP 的获得性耐药与 FA/BRCA 途径的再活化有关^[9]。甚至在对乳腺癌行 CTX 和阿霉素联合化疗中,发现有 FA/BRCA 途径的一种组成蛋白 FANCG 的表达上调^[10]。在临床常用化疗药物中有多种药物为 DNA 交联剂,如丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC)、DDP、CTX、马法兰等,被广泛用于多种实体瘤及血液系统肿瘤的治疗。FA/BRCA 途径可调节对 DDP 及其他 DNA 交联物质所产生的细胞内反应^[11]。本实验结果也证实 FANCD2 单泛素化在多发性骨髓瘤耐药细胞 MOLP-2 / R 中表达明显增强,提示这种耐药性的发生可能与 FA/BRCA 途径活性增强相关。

综上所述,恶性肿瘤化疗药物中常用的一类 DNA 交联剂很可能是通过作用 FA/BRCA 途径来发挥作用,而其继发耐药可能与该途径的活性增强有关。这提示我们可通过抑制该途径的活性来达到

增强化疗药物作用及解除耐药。

参考文献:

- [1] Tai YT, Teoh G, Lin B, et al. Ku86 variant expression and function in multiple myeloma cells is associated with increased sensitivity to DNA damage [J]. *J Immunol*, 2000, 165 (11): 6347-6355.
- [2] Efferth T, Fabry U, Osieka R. Interleukin-6 affects melphalan-induced DNA damage and repair in human multiple myeloma cells [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22 (1A): 231-234.
- [3] L'œuil F, Blom E, Medhurst AL, et al. The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (38): 39421-39430.
- [4] Snow K, Judd W. Characterisation of adriamycin and amsacrine-resistant human leukaemic T cell lines [J]. *Br J Cancer*, 1991, 63 (1): 17-28.
- [5] Nobili S, Landini I, Gligioni B, et al. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7 (7): 861-879.
- [6] Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA. Cancer cell adaptation to chemotherapy [J]. *BMC Cancer*, 2005, 18 (5): 78.
- [7] 王天晓,李明. 肿瘤多药耐药性及其逆转策略 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34 (10): 804-807.
- [8] Mathew CG. Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (43): 5875-5884.
- [9] Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, et al. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors [J]. *Nat Med*, 2003, 9 (5): 568-574.
- [10] Hannemann J, Oosterkamp HM, Bosch CA, et al. Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (15): 3331-3342.
- [11] D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anemia/BRCA pathway [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (1): 23-34.

[编辑:贺文;校对:刘红武]