

耐多柔比星S180荷瘤小鼠模型的建立

盛秀胜¹, 何忠平²(1.金华职业技术学院, 浙江 金华 321017; 2.金华市食品药品检验所, 浙江 金华 321000)

摘要: 目的 采用低剂量多柔比星诱导, 建立耐多柔比星的 S180 的荷瘤小鼠模型。方法 建立腹水型 S180 荷瘤小鼠模型。对荷瘤小鼠反复低剂量应用多柔比星, 逐步诱导产生耐多柔比星的 S180 荷瘤小鼠模型。并通过多柔比星对 S180 杀伤率、流式细胞术动态检测 MDR 表达情况等评价模型建立情况。结果 实验组小鼠自用药后 1 周 MDR 表达逐渐增高, 自第 5 周后显著性增加($P<0.05$), 第 7 周的 P-gp 表达率是第 1 周的近 10 倍。第 5 周时实验组 MDR 阳性表达小鼠占 66.7%, 第 7 周占 77.8%。多柔比星对 S180 杀伤率逐月降低。经传代后腹水型小鼠 S180 细胞的表达稳定。结论 本方法简单方便, 可用于在体肿瘤多药耐药研究。

关键词: 小鼠模型; 耐药; 多柔比星; S180

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)09-0764-04

Establishment of S180 Mouse Model of Multidrug Resistance Induced by Repeatedly Low-Dose Doxorubicin

SHENG Xiusheng¹, HE Zhongping²(1. Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua 321017, China; 2. Jinhua Institute of Food and Drug Control, Jinhua 321000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the mouse model with multidrug resistance(MDR) induced by repeatedly low-dose doxorubicin. **METHODS** The mice inoculated by S180 cells were injected with doxorubicin in low dosage. The expression of MDR gene was assayed by flow cytometry and cellular-killed rate was also determined. **RESULTS** It was found that, in the experiment group, the expression of MDR gene gradually increased after one week of doxorubicin and markedly increased since 5th week of treatment. At 5th week, the percentage of mice with positive MDR gene expression was 66.7% and it was 77.8% at 7th week. And the expression was stable in the cell line. Cellular-killed rate was gradually decreased along with the progress of repeated doxorubicin. **CONCLUSION** The method is simple and can be used *in vivo* MDR study.

KEY WORDS: mouse model; resistance; doxorubicin; S180

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是肿瘤细胞免受药物攻击的重要的细胞防御机制, 是肿瘤细胞对一种化疗药物耐药的同时也对与其结构无关、作用机制不同的其他药物产生交叉耐药的现象^[1]。目前对肿瘤多药耐药的研究多采用细胞系作体外研究的方法^[2-3]。但恶性肿瘤细胞的消亡受到机体免疫系统及化疗药物的影响, 故恶性肿瘤细胞系体外多药耐药的研究, 从某种程度上难以模拟肿瘤细胞在人体内受到化疗作用时的状态。另一方面, 尽管许多化合物在体外具有逆转肿瘤MDR的作用, 但至今尚未找到理想的、可用于临床的逆转剂。因此建立可靠的肿瘤耐药动物模型, 对多药耐药的机理研究和逆转多药耐药新型药物的开发研究, 具有非常重要意义。

鉴于目前国内缺少理想的多药耐药动物模型, 笔者以含有小鼠腹水型肉瘤S180细胞株, 直

接移植于小鼠, 建立小鼠肉瘤模型, 同时以低剂量多柔比星诱导法, 即以低剂量多柔比星为诱导剂, 模仿肿瘤的体内耐药形成过程反复给药, 在荷瘤鼠体内诱导耐多柔比星的小鼠腹水型肉瘤S180细胞株, 诱导MDR相关因子过度表达, 并观察其表达的稳定性, 建立适合药物干预肿瘤多药耐药的在体细胞模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠, ♀ ♂ 各半, (20±2)g; 由浙江大学医学院实验动物中心提供, SPF级小鼠[使用许可证号: SYXK(浙)2007-0098], 适应性喂养1周, 饲养在恒温(23±2)℃, 湿度0.50~0.60, 人工光照明暗各12 h的饲养室内, 标准饲料和自来水自行取用。

1.2 实验药品与仪器

盐酸多柔比星(Doxorubicin HCl), 批号:

基金项目: 浙江省实验动物科技计划项目 (2008F80010)

作者简介: 盛秀胜, 男, 副教授 Tel: (0579)82265085

E-mail: shengsheng117@sina.com

081203B, 浙江海正股份有限公司; 碘化哌啶(PI)、台盼蓝(美国Sigma公司); MDR1表达产物P170(P-糖蛋白, P-gp)、异硫氢酸荧光素标记的单克隆抗体IgG1及免疫阴性对照品IgG1-FITC均为美国pharmingen公司产品; 其余试剂均为分析纯。

FAC Scan 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司); 酶标仪(Sigma 公司, 美国); 二氧化碳培养箱(Heraeus BB16, 上海); -86 °C 低温冰箱(Forma 公司, 美国); Mili-Q50 型纯水器(Millipore 公司, 美国); 光学显微镜(OLYMPUS, 日本); 超净工作台(Hera Safe Heraeus 公司, 德国); Costar 细胞培养瓶和细胞培养板(Corning 公司, 美国); BP61S 型电子天平(Sartorius 公司, 德国); TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂, 上海)。

1.3 S180腹水瘤小鼠的接种

抽取瘤种小鼠腹水2 mL并以1 mL生理盐水稀释, 再以0.2 mL注射于无瘤小鼠腹腔内。随机分为对照组和实验组, 各10只。逐日记录两组小鼠的体重。

1.4 多柔比星给药

实验组小鼠皮下注射多柔比星 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日一次, 连续8周。对照组小鼠皮下注射生理盐水 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 每日一次, 连续3周。2周后一对一传代一次。每次每组小鼠10只。

1.5 多柔比星对S180细胞的杀伤率

从接种之日起每周抽取荷瘤鼠腹水, 经生理盐水洗涤离心($1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min)后分入5支试管用于检测各项目。其中1管用0.4%台盼蓝染色后, 显微镜下计数活细胞数, 按下式求出药物对细胞的杀伤率^[4-5]:

$$\text{细胞杀伤率(\%)} = \frac{\text{对照组活细胞数} - \text{给药组活细胞数}}{\text{对照组活细胞数}} \times 100\%$$

1.6 S180细胞MDR1表达的检测^[4-5]

每周末次给药24 h后, 无菌抽出腹水, 肝素抗凝, pH7.4 PBS液洗涤, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 共3次, 后70%乙醇固定, 4 °C保存。

取70%乙醇固定的小鼠S180细胞, 由pH7.4 PBS液稀释后, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 再次洗脱1次, 并调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 摇匀, 取细胞悬液500 μL , 加入各自相对应的异硫氢酸荧光素标记的鼠抗人的单克隆抗体IgG1工作液20 μL , 另各取1支阴性对照抗IgG1-FITC, 37 °C避光反应30 min后, 由流式细胞仪荧光检测。仪器的检测变异系数

<2%, 测定1万个细胞的上述各种相关生物分子的表达, 激发光波长均为488 nm。

1.7 多药耐药相关因子表达稳定性的检测

多柔比星诱导8周后, 无菌抽取荷瘤小鼠腹水液, 再经一对一传代2次, 每次2周, 其间不再给予多柔比星诱导。4周后无菌抽出腹水液, 检测S180细胞MDR1表达, 处理同“1.6”项下方法。

1.8 统计学方法

实验数据均表示为均数±标准差, 采用SPSS13.0方法统计软件进行数据分析, 采用两样本均数比较的*t*检验, 对统计数据进行分析, 取 $P < 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 对照组及实验组小鼠生长情况

对照组小鼠体重增长明显。该组小鼠自第1周后腹水快速增长, 呈现消瘦、少动、皮毛枯燥, 自第2周起陆续死亡, 第3周时全部死亡。实验组体重增长相对缓慢, 其中3只小鼠无明显腹水增长, 其余小鼠自第10天后腹水明显增长。对照组2周后体重增长为 $(2.1 \pm 1.1) \text{ g}$, 而实验组仅增长 $(1.2 \pm 0.7) \text{ g}$, 结果见表1。

表1 对照组及实验组小鼠体重增长、MDR表达及其细胞杀伤率

Tab 1 The weight gain, expression of MDR gene and cellular-killed rate of the control group and experimental group

组别	小鼠数/ 只	体重增长/g	MDR/%	细胞杀伤率/ %
对照组				
第1周	10	1.0 ± 0.1	1.24 ± 0.37	—
第2周	4	2.1 ± 1.1	1.47 ± 0.44	—
第3周	10		1.36 ± 0.46	—
实验组				
第1周	10	$0.4 \pm 0.1^{1)}$	1.27 ± 0.48	59.12
第2周	9	$1.2 \pm 0.7^{1)}$	2.64 ± 1.11	46.72
第3周	10		2.77 ± 1.24	36.48
第5周	9		$6.53 \pm 2.31^{1)}$	16.27
第7周	9		$12.18 \pm 5.76^{2)}$	9.58

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.2 腹水细胞MDR表达

对照组中各指标在第1、2、3周均无显著性改变($P > 0.05$)。实验组随用药时间延续, MDR水平逐步上升, 自第5周起显著高于第1周($P < 0.01$)。第5周起明显表达MDR小鼠有6只, 占66.7%(6/9), 第7周时有7只, 占77.8%(7/9)。结果见表1、图1。

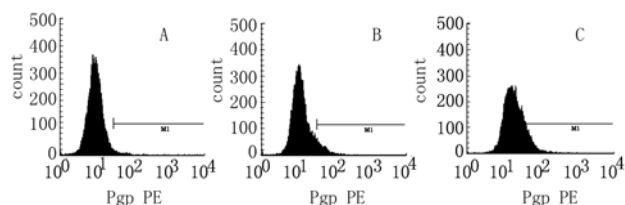


图1 实验组小鼠 S180 细胞 MDR 表达的动态观察

A、B、C分别为第1、5、7周末S180细胞MDR表达定量检测图。M1区为MDR表达阳性细胞定量区域,可见MDR表达量随时间逐渐增高

Fig 1 The different expression of MDR gene of the experimental group

Figure A, B and C was the expression of MDR gene in 1st, 5th and 7th which was assayed by flow cytometry. The region M1 was positive region of the expression of MDR gene.

2.3 多柔比星对腹水细胞的杀伤作用

细胞杀伤率在第一周呈现较高水平,然后逐渐下降,第7周杀伤率下降明显。结果见表1。

2.4 低剂量多柔比星对腹水型小鼠肉瘤细胞P-糖蛋白(P-gp)表达的影响

经低剂量多柔比星诱导7周后,腹水型小鼠S180细胞的P-gp表达明显增加,与对照组比较有统计学意义,再传代4周其表达率未有明显改变,结果见表2。

表2 低剂量多柔比星诱导小鼠细胞 P-gp 表达的稳定性

Tab 2 The stability of the expression of MDR gene which was induced by repeatedly low-dose doxorubicin.

组别	小鼠数/只	P-gp表达率
对照组	10	1.36±0.46
实验组	9	12.18±5.76
再传代组	10	13.12±6.84

3 讨论

目前对恶性肿瘤细胞多药耐药机制和逆转的研究已经成为热点之一,成功建立多药耐药模型是深入研究的前提。当前国内外对耐药机理的认识和逆转剂的研究主要来自体外细胞实验的研究成果,但研究对象是体外诱导的耐药细胞,并不能很好的反映活体肿瘤的情况。在抗癌新药的筛选中,动物模型的作用是体外细胞培养实验无法替代的。多药耐药动物模型的建立及其生物学性质的研究,是研究逆转肿瘤细胞多药耐药性体内实验的必要基础。目前建立耐药动物模型及利用动物模型进行体内诱导耐药性的报道尚不多见^[6-9]。

体内诱导动物模型是研究逆转多药耐药机理的实验基础。建立MDR肿瘤动物模型,目前应用的方法有:转基因法^[10]、耐药性肿瘤细胞悬液移植法^[11]及药物诱导法^[12]。目前比较成熟且应用较多的

是药物诱导法。有作者采用化疗方案诱导的S180荷瘤小鼠,建立在体耐药模型^[4-5,13]。相比较,实验方便,符合人体耐药产生机理,但该方法存在动物死亡率高(笔者预实验数据显示,约40%以上小鼠死亡),且由于多种药物共同作用,影响因素多,可能无法获得相对一致的结果。

若能以低剂量抗肿瘤药物为诱导剂,模仿肿瘤的体内耐药形成过程反复给药,诱导敏感动物,建立在体耐药动物模型。肿瘤在小鼠体内生长以及受到其他外界刺激因素后,其生长的局部微环境能使肿瘤细胞充分表现其生理特性,且整个实验符合产生耐药机理。整个实验操作简单方便,对实验条件要求不高。另外由于采用了小剂量肿瘤药物诱导,动物死亡率不高,实验结果比较一致。

本研究以目前低剂量多柔比星诱导建立了小鼠MDR表达耐药动物模型,应用分子生物学技术动态监测腹水S180瘤细胞受长期持续低剂量多柔比星作用后,MDR基因表达的情况。本研究结果显示对照组1~3周内S180细胞MDR表达量无显著性变化,小鼠因瘤性腹水的大量增加而体重增加,衰竭而死亡。实验组随用药时间延长生存期也明显延长,而MDR表达呈逐渐上升趋势,到第7周时,其MDR表达量较第1周时上升了近10倍,与对照组相比有显著性差异。且经传代后腹水型小鼠S180细胞的表达稳定。经本方法建立的耐药S180小鼠模型,简单方便,可用于在体多药耐药的研究。

REFERENCES

- [1] ROBERT J, JARRY C. Multidrug resistance reversal agents[J]. J Med Chem, 2003, 46(23): 4805-4817.
- [2] LI W D, ZHANG B D, WEI R, et al. Reversal effect of Ganoderma lucidum polysaccharide on multidrug resistance in K562/ADM cell line[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(5): 620-627.
- [3] MARUSZEWSKA A, KOSTRZEWA-NOWAK D, ADAMUS J, et al. The ability of selected pyridinium salts to increase the cytotoxic activity of vincristine but not doxorubicin towards sensitive and multidrug resistant promyelocytic leukaemia HL60 cells[J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(5): 647-653.
- [4] YIN G P, GU Q, CHEN M, et al. Establishment of mouse ascites model induced with S180 cell line to obtained multidrug resistance gene expression [J]. Shanghai J Immunol(上海免疫学杂志), 2001, 21(5): 282-285.
- [5] XU L J, WANG Z M, SUN F J, et al. Establishing mice model of multidrug resistance of tumor induced by combined-chemotherapy [J]. Lab Anim Comp Med(实验动物与比较医学), 2005, 25(4): 215-217.
- [6] RAMACHANDRAN C, WELLHAM L L. Effect of MDR1

- phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in multidrug-resistant human tumor cell lines and xenografts [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(3B): 2681-2690.
- [7] BLANC E, GOLDSCHNEIDER D, FERRANDIS E, et al. MYCN enhances P-gp/MDR1 gene expression in the human metastatic neuroblastoma IGR-N-91 model [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(1): 321-331.
- [8] WARMANN S W, HEITMANN H, TEICHMANN B, et al. Effects of P-glycoprotein modulation on the chemotherapy of xenotransplanted human hepatoblastoma [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2005, 22(5): 373-86.
- [9] ZHAI B J, WU F, SHAO Z Y, et al. Establishment of *in Vivo* adriamycin-induced multidrug resistance models of subcutaneous and hepatic transplanted human liver cancer in nude mice [J]. *Chin J Cancer(癌症)*, 2004, 24(8): 905-909.
- [10] MULLIGAN R C. The basic of gene therapy [J]. *Science*, 1993, 260(5110): 926-931.
- [11] VAN DE VRIE W, MARQUET R L, STOTER G, et al. *In vivo* model in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1998, 35(1): 51-57.
- [12] SATTA T, ISOBE K, YAMAUEHI M, et al. Establishment of drug resistance in human gastric and colon carcinoma xenograft lines [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1991, 82(2): 593-598.
- [13] IHNAT M A, NERVI A M, ANTHONY S P, et al. Effects of mitomycin C and carboplatin pretreatment on multidrug resistance-associated P-glycoprotein expression and on subsequent suppression of tumor growth by doxorubicin and paclitaxel in human metastatic breast cancer xenografted nude mice [J]. *Oncol Res*, 1999, 11(7): 303-310.

收稿日期: 2010-01-15