

胃肠道间质瘤 Imatinib 耐药细胞株的建立及其生物学特性

刘景磊 秦净 姚礼庆 侯英勇 孙益红 沈坤堂 束平

【摘要】目的 建立胃肠道间质瘤耐药细胞模型 GIST882-R。**方法** 采用间歇浓度梯度倍增法体外诱导胃肠道间质瘤细胞株 GIST882 对 Imatinib 靶向治疗耐药,建立耐药细胞模型 GIST882-R。光学显微镜观察亲本细胞 GIST882-S 和耐药细胞 GIST882-R 的细胞形态;流式细胞仪检测细胞周期的变化;噻唑蓝(MTT)比色法绘制细胞生长曲线,计算细胞倍增时间及细胞半数致死浓度(IC₅₀);基因测序检测细胞耐药前后突变位点有无变化。**结果** (1)耐药细胞的细胞形态呈上皮样,核浆比增加;高倍镜下可见多核细胞、胞质内颗粒样物质增多。(2)耐药前后细胞周期分别为 S 期 20.23% 比 17.38%, G₀/G₁ 期 68.33% 比 72.25%, G₂/M 期 11.44% 比 10.37%, 变化差异有统计学意义($P < 0.01$)。(3)GIST882-R 的倍增时间(47.10 ± 2.01) h, 长于亲本细胞株 GIST882-S(39.56 ± 1.18) h ($P < 0.01$);耐药细胞 GIST882-R 较 GIST882-S 对 Imatinib 的 IC₅₀ 显著增高,分别为(1.549 ± 0.366) μmol 和(0.136 ± 0.025) μmol, 耐药指数为 11.39 ($P < 0.01$)。(4)对 GIST882-R 和 GIST882-S 进行 Kit 基因测序,两者均存在 13 外显子 K642E 突变,但在 GIST882-R 中未发现新的基因突变。**结论** 成功获得耐药细胞 GIST882-R, GIST882-R 对 Imatinib 靶向治疗的敏感性明显降低。

【关键词】 胃肠道间质瘤; 细胞株; Imatinib; 耐药

Establishment and biological characters of an Imatinib-resistant cell line of gastrointestinal stromal tumor LIU Jing-lei*, QIN Jing, YAO Li-qing, HOU Ying-yong, SUN Yi-hong, SHEN Kun-tang, SU Ping. *Department of General Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China Corresponding author: QIN Jing, Email: qin.jing@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】Objective To establish the Imatinib-resistant model GIST882-R. **Methods** The intermittent concentration gradient doubling method was used to get Imatinib-resistant cell line GIST882-R. Changes of cell morphology were observed and compared under the optical microscopy. Changes of cell cycle were assayed and compared by using flow cytometer. The growth curvature, doubling time and IC₅₀ were calculated by using methylthiazol tetrazolium (MTT) assay. Gene sequencing was applied to detect DNA mutation. **Results** (1) Significant changes occurred to the morphologic profiles, such as epithelioid shaped, the increased ratio of nucleolus to cytoplasm, emerging multinucleate cell, increase of granule substances; (2) The cell cycle of GIST882-S and GIST882-R was respectively 20.23% and 17.38% in S phase, 68.33% and 72.25% in G₀/G₁ phase, 11.44% and 10.37% in G₂/M phase respectively ($P < 0.01$); (3) The doubling time of GIST882-S and GIST882-R was (47.10 ± 2.01) h and (39.56 ± 1.18) h respectively ($P < 0.01$). IC₅₀ for GIST882-S and GIST882-R was (1.549 ± 0.366) μmol and (0.136 ± 0.025) μmol respectively ($P < 0.01$). The resistance of GIST882-R to Imatinib was 11.39 fold of GIST882-S cells; (4) K642E mutation of exon 13 was found in both GIST882-S and GIST882-R. **Conclusion** The sensitivity of GIST882-R to Imatinib treatment is decreased significantly.

【Key words】 Gastrointestinal stromal tumor; Cell line; Imatinib; Drug resistance

Imatinib 作为酪氨酸激酶抑制剂,是转移复发 GIST 患者的一线靶向治疗药物,疾病控制率达到 60% ~ 80%^[1-2]。然而随着 Imatinib 分子靶向治疗患者的随访,发现约 50% 的患者在服用 Imatinib 期间疾病再

次进展^[2-3]。随着 Imatinib 治疗过程中耐药问题的日益突出,对 GIST 耐药机制进行研究就极为重要。国外已经有敏感胃肠道间质瘤细胞株 GIST882 建系的报道^[4-5]。我们选取 Imatinib,诱导胃肠道间质瘤细胞株 GIST882 耐药,建立耐药的 GIST-R 细胞模型。

材料与方 法

1. GIST882 细胞培养:GIST882 细胞株由哈佛大学医学院附属布莱根妇科医院 Flechter 教授惠赠。细胞培养基为含 10% 胎牛血清(Gibco/Invitrogen)的 RPMI

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2011.03.014

基金项目:上海市科委科研基金资助项目(064119622)

作者单位:200032 上海,复旦大学附属中山医院普通外科[刘景磊(现在山东省立医院普外科,250021)、秦净、姚礼庆、孙益红、沈坤堂、束平],病理科(侯英勇)

通信作者:秦净,Email:qin.jing@zs-hospital.sh.cn

1640 (Gibco/Invitrogen) 完全培养基。将细胞置入 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度培养箱培养。

2. 耐药细胞株的诱导: 采用逐步递增 Imatinib 浓度, 间歇作用的方法, 诱导细胞耐药^[6]。待细胞进入对数生长期后, 换为含 Imatinib 的培养基, 培养基 Imatinib 作用终质量浓度从 0.1 μmol 起始, 48 h 后改为完全培养基培养, 待其恢复正常生长, 消化传代, 如此反复至细胞能在 Imatinib 浓度为 0.1 μmol 的培养基中稳定传代。逐步倍增药物浓度, 并且重复上述步骤, 直至培养出能够在 Imatinib 浓度为 0.8 μmol 的培养基中稳定生长并传代的 GIST882-R 细胞。

3. 细胞形态学观察: 细胞爬片, 苏木素-伊红 (HE) 染色和细胞免疫化学染色在倒置显微镜下观察细胞 GIST882-S 和 GIST882-R 的细胞形态及肿瘤标志物表达。

4. 测定细胞生长曲线并计算倍增时间: 将对数生长期的 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞, 以浓度 2 × 10⁴/ml 分别接种在 96 孔板, 间隔 24 h 分别取 3 个复孔, 计数每孔活细胞数量, 连续计数 7 d, 按每天计数细胞数量绘制细胞生长曲线。根据公式计算细胞的倍增时间: $T = t \times \lg 2 / \lg (N_t / N_0)$ (其中 T 为群体倍增时间, t 为连续培养时间, N_t 为终末细胞数, N₀ 为初始细胞数, 单位为小时)。

5. 检测细胞周期: 取对数生长期细胞 GIST882-S 和 GIST882-R 各 1 瓶, 消化后离心, 冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 振荡, 重悬, 70% 冷乙醇固定过夜, 离心弃上清, 冷 PBS 洗 2 次并重悬, 移入流式细胞仪离心管中, 加入 1 ml 碘化丙锭 (PI), 37 °C 避光温浴 30 min, 用 FACS-420 型流式细胞仪分析细胞周期。

6. 细胞株对 Imatinib 的药物敏感性检测: 取对数生长期的 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞, 96 孔板中每孔接种 2 × 10⁴ 个, 培养 72 h 后向 96 孔板中加入药物浓度分别为 0.000 01、0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10、100 μmol, 的 Imatinib 溶液, 每个浓度设置 6 个复孔, 同时设立无药对照和空白对照。同样条件培养 24 h。噻唑蓝 (MTT) 比色法测定各孔吸光度值 (A), 各测试孔 A 值减去空白对照孔 A 值为实际值 A。细胞存活率 (%) = (实验孔 A 值/无药对照孔 A 值) × 100%。以药物浓度为横轴, 存活率为纵轴绘制浓度效应曲线。根据公式 $\lg IC_{50} = X_m - I (P - (3 - P_m - P_n) / 4)$ 计算 IC₅₀ (X_m: lg 最大剂量, I: Lg 最大剂量/相临剂量, P: 阳性反应率之和, P_m: 最大阳性反应率, P_n: 最小阳性反应率)。

7. 基因测序: 采用 Sigma 公司 DNA 抽提试剂盒, 严格按说明提取对数生长期 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞的 DNA, 送上海生物工程技术有限公司对

Kit 及 PDGFR 基因进行测序。

8. 统计学方法: 运用 Excel2003 绘制生长曲线及浓度效应曲线, 应用 SPSS 11.0 统计软件分析。多组样本间差异检验应用单因素方差分析, 然后 Bonferroni 法进行两两检验; 样本间构成比的检验用 person 卡方。

结 果

1. 细胞形态学观察: 免疫细胞化学染色见 GIST882 细胞株 CD117 100% (+) 表达, CD34 部分 (+), SMA (-)。在光学显微镜下, GIST882-S 细胞呈长梭形, 细胞狭长, 细胞 100% 融合时细胞仍紧密生长, 呈明显的旋涡状。GIST882-R 细胞长梭形及旋涡状生长的形态消失, 细胞变短, 核浆比增加; 细胞成簇聚集生长, 高倍镜下可见部分 GIST882-R 呈多核细胞, 胞质内颗粒样物质增多。

2. 细胞周期变化: 流式细胞仪检测细胞周期, 耐药前后细胞周期分别为 S 期 20.23% 比 17.38%, G₀/G₁ 期 68.33% 比 72.25%, G₂/M 期 11.44% 比 10.37%, 耐药细胞 G₀/G₁ 期细胞比例增加, S、G₂/M 期比例降低, 变化差异有统计学意义 (P < 0.01)。

3. 细胞增殖速度及对药物敏感性的变化: GIST882-R 的倍增时间 (47.10 ± 2.01) h 长于 GIST882-S (39.56 ± 1.18) h; 耐药胞 GIST882-R 较亲本细胞株 GIST882-S 对 Imatinib 的 IC₅₀ 显著增高, 分别为 (1.549 ± 0.366) μmol 和 (0.136 ± 0.025) μmol, 耐药指数为 11.39, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。在含有 1/10 000 浓度 DMSO 的培养基中培养的 GIST882-S (DMSO) 细胞的倍增时间 (40.35 ± 1.33) h 及 IC₅₀ (0.161 ± 0.029) μmol, 与在完全培养基中培养的 GIST882-S 细胞差异无统计学意义 (P > 0.05), 说明 1/10 000 浓度 DMSO 对 GIST882 细胞的生长和药物敏感性无影响 (图 1, 2, 表 1)。

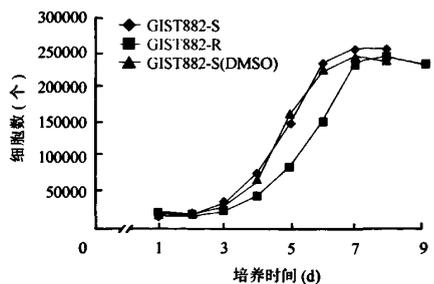


图 1 细胞生长曲线

4. 细胞基因检测结果: 获得耐药细胞后, 对敏感细胞 GIST882-S 和耐药细胞 GIST882-R 分别进行基因测序, 在敏感细胞 GIST882-S 中检测到 Kit 基因 13 外显

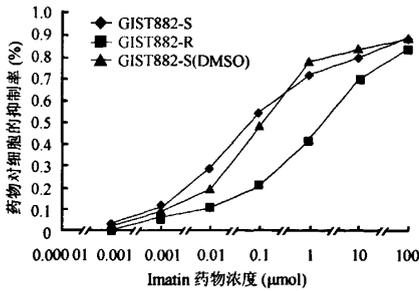


图 2 Imatinib 对细胞的浓度抑制效应

表 1 各细胞株倍增时间及半数药物抑制浓度 (IC₅₀, $\bar{x} \pm s$)

细胞株	细胞倍增时间 (h)	IC ₅₀ (μmol)
GIST882-S	39.56 ± 1.18	0.136 ± 0.025
GIST882-R	47.10 ± 2.01	1.549 ± 0.366
GIST882-S(DMSO)	40.35 ± 1.33	0.161 ± 0.029

注: GIST882-S 同 GIST882-S(DMSO) 比较, P > 0.05; GIST882-R 同 GIST882-S 比较, P < 0.01; GIST882-R 同 GIST882-S(DMSO) 比较, P < 0.01

子纯和性 K642E 突变, 9、11、17 外显子未发现突变, 和文献报道结果相同。在耐药细胞 GIST882-R 中测得同样结果, 未检测到文献报道的二次突变。

讨 论

随着胃肠道间质瘤诊断标准的确立, 人们对 GIST 有了进一步的认识。但对 GIST 的生物学行为仍难以预测^[7]。复发或转移的 GIST 患者预后通常很差, 如没有采取干预措施, 中位生存时间在 6 ~ 18 个月^[8]。国外已经建立的 GIST 成熟细胞株有 GIST-T1、GIST882。GIST882 细胞株是美国哈佛大学医学院 Fletcher 教授建立的一株间质瘤细胞株, 对 Imatinib 高度敏感。GIST882 细胞呈长梭形, 细胞狭长, 细胞 100% 融合时仍紧密生长, 呈明显的旋涡状, 肿瘤标志物 CD117 (100% +), CD34 (部分 +), SMA (-), 存在 13 外显子 K642E 位点突变。GIST882 建系至今已有 10 年时间, 仍稳定传代。

目前国内外建立肿瘤耐药细胞株的方法主要有药物浓度递增持续作用法 (stepwise continuous selection) 和药物间歇诱导法 (high dose intermittent selection) 两种。本研究将两种方法混合使用, 逐渐递增药物浓度, 诱导出对 Imatinib 靶向治疗继发耐药的 GIST882-R 细胞, 该细胞的 IC₅₀ 为 1.549 μmol, 耐药指数为 11。Snow 认为耐药指数小于 5 的是低度耐药, 耐药指数 5 ~ 15 的是中度耐药, 耐药指数大于 15 的是高度耐药。按此标准划分 GIST882-R 细胞对 Imatinib 为中度耐药。

GIST882 细胞产生耐药性后, GIST882-R 较 GIST882-S 在形态学上发生了一系列的变化, 如: 长梭

形形态消失, 核浆比增加; 细胞呈旋涡状生长的形态消失, 细胞成簇聚集生长; 高倍镜下可见部分 GIST882-R 呈多核细胞, 胞质内颗粒样物质增多。细胞形态结构的变化必然和其功能改变相联系。我们推测细胞变短引起吸收面积减少, 从而降低细胞内的药物含量。胞质内颗粒样物质增多可能和内质网扩张、高尔基体增多、线粒体功能活跃有关。内质网是细胞内蛋白、糖和脂类等物质合成的主要场所, 内质网的扩张、高尔基体数量增加, 提示细胞内蛋白合成及分泌活跃, 从而为细胞代谢解毒、转移清除外来化合物和抗损伤修复等与耐药性相关功能活动的发挥提供必要的物质保障。线粒体是细胞的“能源中心”, 功能活跃可为细胞对抗药物提供所需的能量。

流式细胞仪检测细胞周期, 发现耐药前后细胞周期发生变化, S 期 22.30% 比 17.38%, G₀/G₁ 期 68.33% 比 72.25%, G₂/M 期 11.44% 比 10.37%, GIST882-R 细胞的 G₀/G₁ 期细胞比例增加, S、G₂/M 期比例降低。GIST882-R 的倍增时间长于 GIST882-S。该现象提示较多耐药细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, DNA 的合成减少, 有丝分裂的速度减慢。对抗药物毒性消耗了大量用来合成 DNA 及有丝分裂的能量。所以在有药物存在的情况下, 亲本细胞株可能死亡而耐药株得以生存, 但耐药细胞由于需要额外的生理活动以抵抗药物, 会使倍增速率减慢, 倍增时间延长。

本研究表明, 诱导出的 GIST882-R 细胞在细胞形态、超微结构、细胞周期及生长速度上发生了变化, 符合耐药细胞的特点。GIST882-R 细胞可作为研究耐药机制和筛选耐药逆转剂的细胞模型。

参 考 文 献

- [1] Mehren M, Blanke CD. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med, 2002, 347: 472-480.
- [2] Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib; randomized trial. Lancet, 2004, 39: 1127-1134.
- [3] Cristina R, Peter B, Tianhua G, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. Cancer Ther, 2005, 11: 4182-4190.
- [4] Taguchi T, Sonobe H, Toyonaga S, et al. Conventional and molecular cytogenetic characterization of a new human cell line, GIST-T1, established from gastrointestinal stromal tumor. Laboratory Investigation, 2002, 82: 663-665.
- [5] Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, et al. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. Oncogene, 2001, 20: 5054-5058.
- [6] 李大卫, 彭志海, 吴睛, 等. 胃癌顺铂耐药细胞株的建立和基因表达谱分析. 中华实验外科杂志, 2009, 26: 31-33.
- [7] 梁建芳, 吴人亮, 徐钧, 等. 胃肠道间质瘤中 MDm2 和 p53 蛋白的表达与预后的关系. 中华实验外科杂志, 2007, 24: 1078-1079.
- [8] 侯英男, 朱雄增. 胃肠道间质瘤. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2006: 175-184.

(收稿日期: 2010-02-21)