

流式细胞技术 (FCM) 在人乳腺癌耐药细胞系耐药逆转研究中的应用

魏熙胤 牛瑞芳 杨毅 史玉荣

(天津肿瘤医院 肿瘤学中心实验室 天津 300060)

摘要 目的: 人乳腺癌耐药细胞系 (MCF-7/ADR) 经不同逆转方法作用后, 对耐药逆转结果进行检测, 寻找最佳逆转方法。方法: 用流式细胞仪, 分别对 MCF-7 及经不同逆转剂作用后 MCF-7/ADR 进行检测。结果: 经流式细胞仪检测, P-170 表达: MCF-7 为 11.4%, MCF-7/ADR 为 99.2%, 不同逆转剂作用细胞后各实验组 P-170 表达均大幅度下降。经 PI 染色后, 不同逆转剂逆转 MCF-7/ADR 的细胞周期无明显变化。结论: 异博定结合干扰素及加温的方法, 逆转效果最佳。

关键词 流式细胞术 乳腺癌 耐药逆转

流式细胞术 (FCM) 是利用流式细胞仪对微小生物颗粒物的多种物理、生物学特性进行定量、分析检测的技术。流式细胞仪是当代激光、流体力学、光学和电子计算机等学科技术高度发展的产物, 是生命科学研究领域中先进的仪器之一。

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤, 占女性肿瘤发病率的第二位。乳腺癌是实体瘤中应用化疗最有效的肿瘤之一, 化疗在整个治疗中占重要的地位, 但由于多药耐药现象的产生从而导致化疗失败并由此引起肿瘤的复发与转移。多药耐药产生的机制很复杂, 其中多药耐药 MDR1 基因编码的 P-糖蛋白 (PglycoProtein, P-gp) 的过度表达是产生多药耐药 (Multi-Drug Resistance) MDR 的主要耐药机制。P-gp 是一种能量依赖性药物排出泵, 通过 ATP 供应能量, 它可将抗肿瘤药物由细胞内泵出, 使其细胞毒作用减弱或消失, 出现耐药性, 从而导致化疗失败。因此如何克服多药耐药, 提高肿瘤病人的生存率, 已成为当前研究的重要课题。目前认为解决 MDR 问题主要有两种方法, 一种是寻找对 MDR 细胞有效的抗肿瘤药物, 另一种是通过增加细胞内药物浓度而逆转 MDR。MDR 逆转工作已成为当前肿瘤防治研究的热点。利用体外培养的各种肿瘤 MDR 细胞系做为研究该肿瘤的 MDR 模型, 已筛选出了多种逆转剂如异博定及环孢霉素 A 等。它们主要通过抑制 P-gp 外排药物的功能, 从而增加细胞内化疗药的浓度而逆转耐药。但由于

此类逆转剂存在剂量依赖性毒性作用, 且对化疗药代学有一定影响, 使其不能达到体内完全逆转的有效浓度, 从而限制了临床应用。为此目前国内外的研究热点转向筛选效果更可靠, 毒副作用更小的逆转剂, 另一新进展是逆转剂的联合应用。

本实验运用流式细胞术并以具有 MDR 表型的人乳腺癌 MCF-7/ADR 耐药细胞系及 MCF-7 敏感细胞系为体外实验模型, 对 MDR 的逆转剂应用及筛选毒副作用较小而逆转效果比较高的逆转剂联合应用的方法, 对加温联合 IFN- α 、异博定逆转耐药作用及机制进行了初步探索。

1 流式细胞仪的原理

流式细胞术是一种自动分析细胞的高新技术, 其原理是悬浮在液体中的分散细胞一个个地依次通过测量区, 每个细胞通过测量区时产生电信号, 这些信号可以代表荧光、散射光、光吸收或细胞的光阻抗等。这些信号被测量, 存贮、显示, 于是细胞的一系列重要的物理特性和生化特性就被快速地、大量地测定。仪器还可以根据所规定的参量把指定的细胞亚群从整个群体中分选出来。流式细胞术具有对细胞分析和分选的功能, 是近年来荧光细胞分析技术的创举, 开创了生物细胞研究的新领域。其工作原理是待测细胞被制成单细胞悬液, 经特异性荧光染料染色后加入样品管中, 在气体压力推动下进入流动室。流动室内充满鞘液, 在鞘液的约束下, 细胞排成

单列由流动室喷嘴喷出,并被鞘液包绕形成细胞液柱。这种同轴流动的设计,使得样品流和鞘液流形成的流束始终保持着一种分层鞘流的状态,样品流呈中心轴流状态,通过调节液流的气体压力装置系统,使鞘液直径保持在50~100 μm 左右,使样品流的直径在30 μm 左右。鞘液和样品流组成一个圆形的流束,一起自喷嘴的圆形宝石孔喷射出来,进入流动室,与水平方向的激光光束垂直相交。该区称为测量区。利用样品流和鞘流的气压差(鞘液流略大于样品流)的层流原理,使细胞依次排列成单行,每个细胞以均等的时间依次通过测量区,被荧光染料染色的细胞受到强烈的激光照射后发出荧光,同时产生散射光。荧光信号可在与激光光束垂直的90°方向,距喷嘴顶部0.25mm处进行探测。光散射信号在前向小角进行探测,这种测量称为“前向角光散射”。在这种情况下产生的光散射信号基本上反映了细胞体积大小。细胞发出的荧光信号和散射光信号,同时被呈90°角方向的荧光光电倍增管和前向光电二极管接收,被积分放大后转换为电子信号输入电子信息接收器,在多道脉冲高度分析仪的荧光屏上,以一维组方图或二维点阵图及数据表或三维图形显示出,并由x-y轴打印机将资料打印出来,或存入磁盘,以备分析。计算机快速而精确地将所测数据计算出来,结合多参数分析,从而实现了细胞的定量分析。流式细胞术可检测细胞的很多参数。被测的参数可分为两类:一类是内部参数,指不用任何荧光染料标记就可以测量的细胞参数;另一类为外部参数,指需要外加荧光染料标记的细胞参数。同时又可可将细胞参数分为结构参数和功能参数。结构参数描述细胞的形态特征和化学组成,功能参数是描述细胞的理化特性。

2 FCM在人乳腺癌耐药细胞系耐药逆转研究中的应用

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

(1) 细胞及培养条件:

人乳腺癌多药耐药细胞系MCF-7/ADR及其药物敏感细胞系MCF-7由美国底特律医院侯子正先生馈赠。培养于15%胎牛血清1640培养液

(GIBCO, BRL)中,其中MCF-7/ADR培养液中含1 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素,37℃5%CO₂培养,取对数生长期细胞用于实验。

(2) 试剂及关键仪器:

PE荧光标记P-170单抗及含RNA酶PI染料均为Immunotech公司产品,流式细胞仪为BeckmanCoulter EPICS-XL。

2.1.2 实验方法

(1) 对照组MCF-7, MCF-7/ADR。

(2) 实验组

A. 加药组

单用逆转剂组:异博定、IFN- α 。联合逆转剂组:异博定加IFN- α 。

B. 加温联合逆转剂组:

在加药分组基础上,在各组加药液与细胞混合时,于42.5℃超级恒温水浴加温1h,并设单加温对照组。

2.1.3 药物浓度用完全培养液将药物母液稀释成不同浓度的药物工作液,实验用药物终浓度为:

异博定 10 $\mu\text{mol/L}$ IFN- α 1000u/mL

2.2 实验步骤

2.2.1 细胞P-170检测方法

取对照组及各实验组培养72h后的细胞,消化液消化,用培养液终止,滴管吹散细胞,将细胞悬液移入50mL塑料离心管中,1000rpm离心5min,去上清,再用生理盐水洗一次,1000rpm离心5min,去上清,计数细胞,每1 $\times 10^6$ 细胞/mL加20 μL LPE标记的P-170单抗,室温避光孵育半小时,流式细胞仪检测。

2.2.2 细胞周期分析方法:

取对照组及各实验组培养72h后的细胞,消化液消化,用培养液终止,滴管吹散细胞,将细胞悬液移入50mL塑料离心管中1000rpm离心5min,去上清,再用生理盐水洗一次,1000rpm离心5min,去上清。边摇边慢慢滴加乙醇使终浓度达75%,放4℃冰箱固定18h以上,取出离心去上清,再加生理盐水洗一次,离心去上清,计数细胞,每1 $\times 10^6$ 细胞/mL加入含有RNA酶的PI荧光染料1mL,用滴管吹打均匀,室温避光染色30min,流式细胞仪检测。

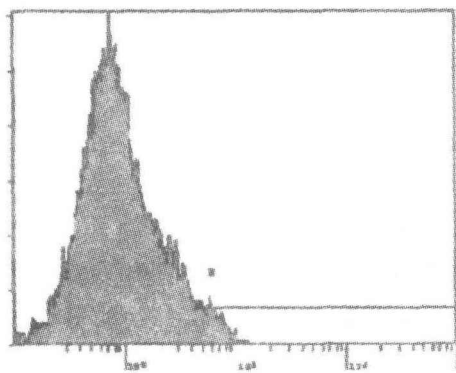
3 结果

3.1 不同逆转剂逆转 MCF-7/ADR 细胞 P-170 表达:

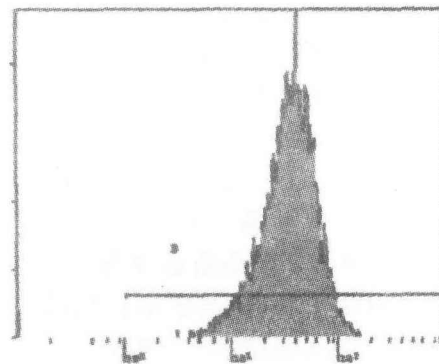
经流式细胞仪检测, P-170 表达: MCF-7 为 11.4%, MCF-7/ADR 为 99.2%, 不同逆转剂作用细胞后各实验组 P-170 表达均大幅度下降, 见表 1, 图 1、2。

表 1 逆转剂逆转 MCF-7/ADR 细胞系 P170 的表达

试验分组	阳性率%
MCF-7	11.4%
MCF-7/ADR	99.2%
MCF-7/ADR + IFN- α	47.0%
MCF-7/ADR + 异博定	43.2%
MCF-7/ADR + IFN- α + 异博定	39.8%
MCF-7/ADR 加温	38.6%
MCF-7/ADR 加温 + IFN- α	37.7%
MCF-7/ADR 加温 + 异博定	25.7%
MCF-7/ADR 加温 + IFN- α + 异博定	24.7%

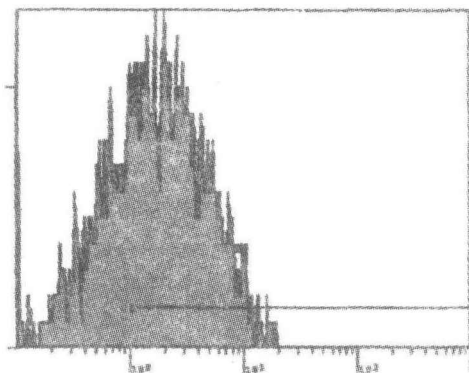


MCF-7 (11.4%)

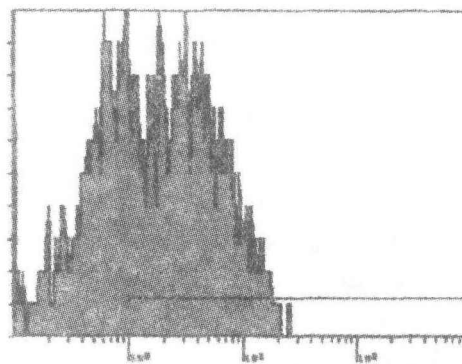


MCF-7/ADR (99.2%)

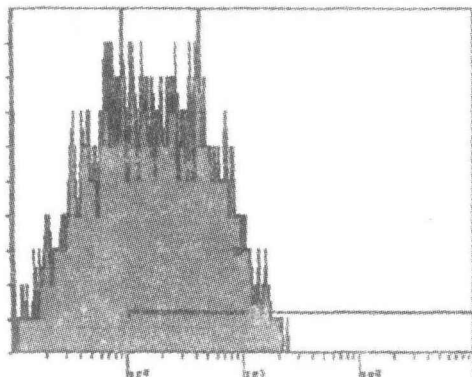
图 1



MCF-7/ADR+IFN- α (47.0%)



MCF-7/ADR+ 异博定 (43.2%)



MCF-7/ADR+IFN- α + 异博定 (39.8%)

图 2

3.2 不同逆转剂逆转 MCF-7/ADR 细胞周期分布

流式细胞仪检测各实验组之间无明显变化。

4 讨论

1981年日本学者 Tsuruo 首次报道非细胞抑制剂异博定能逆转肿瘤细胞对 VCR 和长春花碱 (VCB) 的抗药性, 指出异博定浓度在 $1 \sim 3 \mu\text{L}/\text{mL}$ 时, 能完全克服抗 VCR 的 P388 白血病细胞的抗药性, 从而使 VCR 的抗癌效果明显增强, 并能延长实验动物的生存期。异博定为钙离子阻滞剂, 可以与抗肿瘤药物竞争结合 P-gp 位点, 它能有效的降低 P-gp 的外输泵作用, 增加细胞内肿瘤药物浓度, 增加化疗药对癌细胞的杀伤力, 恢复肿瘤细胞对抗癌药物的敏感性。我们的实验结果, MCF-7/ADR 细胞用 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 异博定处理 72h 后, P-170 有所下降, 与耐药细胞系相比下降了 56.5%, 进一步证明异博定逆转耐药机理。

干扰素是 Isaacs 和 Lindenmann 于 1957 年发现的, 经研究表明干扰素是多功能细胞因子组成的同源家族, 是一类具有广泛生物活性的复杂的诱生蛋白系统, 临床实践已证明了 IFN 是重要的抗癌药物, 1994 年 Wolfgang 报道 IFN- α 直接作用于 P-gp, 而不是竞争 P-gp 的药物结合部位。本实验结果 IFN- α 能降低 P-gp 表达 (47.0%), 比耐药细胞下降 52.6%。细胞周期及形态学则无明显变化。

IFN- α 联合异博定对 MDR 逆转结果与单用异博定、IFN- α 对 MDR 进行逆转结果相比, P-糖蛋白的表达水平明显下降。提示可以尝试降低异博定用量, 与 IFN- α 联合应用而达到与单用异博定相同的效果, 减轻异博定对人体的毒副作用, 临床应用 IFN 的毒副作用小, 反应轻而短暂, 具有较大的研究价值及应用前景。热疗具有悠久的历史, 实验发现组织受热升温至 $41 \sim 45^\circ\text{C}$ 并维持数十分钟以上, 可以杀灭哺乳动物的癌细胞, 这一结论已在临床肿瘤热疗中得到证实, 并已成为临床肿瘤治疗时的一项最基本的生物学量化依据。体外实验证明 42°C 加温 2h 可使化疗药物的抗癌作用更强 10 ~ 100

倍。根据大量研究证实, 加温和化疗药对于肿瘤细胞具有明显的互补和增效作用, 且无毒副作用。据报道目前高温与药物协同的抗癌机理为: 1. 加温可破坏细胞膜的稳定状态, 使细胞膜的通透性增加; 2. 由于膜通透性的改变, 增加了细胞对药物的吸收和渗透; 3. 加温可提高细胞内药物的浓度及反应速度; 4. 加温可改变药物代谢的机理; 5. 加温增加了药物与 DNA 的作用或抑制 DNA 的修复。

本实验结果提示 1. 单独加温 42.5°C 1h, 具有逆转耐药作用; 2. 加温联合耐药逆转剂, 具有协同逆转耐药作用; 3. 加温本身是常规应用的治疗肿瘤的方法, 简单、经济、对机体无副作用, 与逆转剂联合应用, 可望降低逆转剂的用量, 减低其对人体的毒副作用, 而达逆转的目的, 是一种理想的逆转 MDR 的新方法; 4. 国内外未见同样报道, 此方法为临床治疗耐药病人, 闯出一条逆转治疗的新路, 将会提高肿瘤化疗疗效。

在本实验中流式细胞术充分发挥其定量准确、快速、检测标本量大等特点, 随着流式细胞术的进一步推广它将在医学、生物学等领域中发挥其巨大的作用。

参考文献

- 1 Filipits M et al MRP and MDR-1 gene expression in primary breast carcinomas. Clin Cancer RES. 1996. 2: 1231 ~ 1237.
- 2 张荣河. 异博定对耐阿霉素人乳腺癌细胞系多药耐药的逆转作用. 中国肿瘤临床, 1994, 28 (6): 426 ~ 427.
- 3 韩俊领等. 异博定与它莫西芬联合逆转高三尖酯碱耐药的体外研究. 中华血液学杂志, 1997, 18 (30): 143.
- 4 张天泽 徐光炜主编. 肿瘤学, 天津: 天津科学技术出版社. 1996 年, 第一版.
- 5 杨纯正. 肿瘤耐药研究进展及逆转对策, 中华血液学杂志 1997, 2 (18): 59 ~ 60.
- 6 Homolga L A new method for quantitative assessment of P-glycoprotein related multidrug resistance in tumor cells. Br J Cancer 1996, 73 (7): 849 ~ 855.
- 7 沈关心 周汝林主编. 现代免疫学实验技术, 武汉: 湖北科学技术出版社 1998 年, 第一版.

(上转第 35 页)

该模块内的通道,其他样品经主要通道直接进入后面的模块,这样节省了时间和空间。需重测的样品经返回通道回到样品入口处进行重新测定。这样,仪器可根据实际情况安排最合理的检测流程,缩短出报告时间,最大可能的提高工作效率。

E170 系统每个模块有 25 个试剂位,每小时可进行 170 个测试。目前可联 4 个模块。

4 临床应用

目前 E170 可检测 49 个项目,包括甲状腺功能 9 项,如 T3、T4、FT3、FT4、TSH、甲状腺球蛋白等。肿瘤标记物 10 项,如 AFP、CEA、CA125、CA19-9、CA15-3、CA72-4、NSE、CYFRA21-1、PSA、FPSA。肝炎指标测定 8 项,如 HbsAg、抗 Hbs、抗 HBe、抗 Hbc-IgM、HbeAg、抗

HBe、甲肝抗体、甲肝抗体 IgM。激素 8 项,包括黄体生成素、促卵泡成熟激素、催乳素、雌二醇、孕酮、睾酮、 β 绒毛膜促性腺激素、硫酸脱氢表雄甾酮。心肌标志物:包括肌钙蛋白 T、肌酸激酶、肌红蛋白、洋地黄、地高辛。贫血检测:铁蛋白、叶酸、维生素 B12、红细胞内叶酸。其他:甲状旁腺素、骨钙素、胰岛素、IgE、可的松等。

参考文献

- 1 王金良. 迈向 21 世纪的医学检验技术, 中华医学检验杂志, 1998, 21 (6): 381
- 2 韩佩珍. 化学发光免疫分析, 国外医学, 放射医学核医学分册, 2000, 24 (5): 196

The ELECSYS's series full-automatic electrochemistry luminescence immunity analyzer and its clinical applications

Yang Tiesheng Zhang Zheng

(Peking University People's Hospital Beijing 100044)

Abstract The immune assay is applying in clinical each domain of more and more extensive. The major method used at present includes chemistry luminescence and electrochemistry luminescence etc. The full use that the apparatus was analysed in the active immunity has raised the inspection quality, and increased the checkout scope, and has raised work efficiency. The Elecsys's series full-automatic electrochemistry luminescence immunity analyzer is applying the more extensive immunity measurement instrument, and can be in progress ascertaining by measuring like the tumor marker, the hormone is ascertained by measuring, infectious disease antibody measurement and the special protens measurement etc. This series has 3 kinds of systems: Elecsys1010, Elecsys2010, E170. Respectively is suitable in different laboratories and detection center, is one kind of comparatively ideal immunity analysis instrument.

Key words Electrochemistry luminescence Immunoassay Modular

(下接第 39 页)

Application of flow cytometry in reversal of multi-Drug resistance in breast cancer cell line

Wei Xiyin Niu Ruifang Yang Yi Shi Yurong

(Central laboratory on oncology, Tianjin Cancer Hospital Tianjin 300060)

Abstract Objective: Human breast cancer cell line with drug resistance (MCF-7/ADR) was treated by kinds of reversal methods. To detect the result and investigate the best reversal methods. Methods: The P-glycoprotein (P-gp), a product of the multi-drug resistance gene was detected by flow cytometry. Results: The positive rate of P-glycoprotein on breast cancer cell line MCF-7 and MCF-7/ADR was 11.4% and 99.2%, respectively. The expression of P-glycoprotein of MCF-7/ADR was significant descent in the experiment groups, but the distribution of cell cycle did not change through detecting the result of PI staining. Conclusion: The reversal action of Interferon- α combined with Verapamil and hyperthermia was the best method in breast cancer cell line MCF-7/ADR.

Key words Flow Cytometry Breast cancer Reversal of multi-drug resistance