

紫杉醇诱导的人白血病 CCRF-CEM 多药耐药细胞模型的建立

朱金武, 关勇彪

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 建立稳定的紫杉醇(paclitaxel)诱导的人肿瘤多药耐药细胞系, 并对其生物学特点进行评价。方法 用亚致死浓度(1/50 IC_{50} 值)的紫杉醇连续诱导对化疗药物敏感的人急性 T 淋巴细胞白血病 CCRF-CEM 细胞, 使其成为对紫杉醇耐药的 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞, 同时观察 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对柔红霉素(daunorubicin)和长春碱(vinblastine)的交叉耐药; 用相应的单抗和 FITC 标记的二抗与细胞孵育后, 用流式细胞仪分别检测细胞表面和细胞总 P 糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白 1(MRP1)和肺癌耐药相关蛋白(LRP)等表达水平的变化, 并用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率的变化。结果 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞传至第 90 代时, 对紫杉醇产生了耐药, 耐药倍数约为 256.4 倍; 同时对柔红霉素和长春碱也产生了耐药, 耐药倍数约为 9.8 和 2.0 倍。与 CCRF-CEM 细胞比较, CCRF-CEM/paclitaxel 细胞表面 P-gp 和细胞总 P-gp 表达分别升高了 18.8 和 14.4 倍, MRP1 和 LRP 分别升高了 2.1 和 1.2 倍; S 期细胞比例由 $(48.3 \pm 1.2)\%$ 降低至 $(23.8 \pm 0.5)\%$, 细胞凋亡百分率由 $(7.82 \pm 0.19)\%$ 减少至 $(2.47 \pm 0.37)\%$ 。结论 成功建立了稳定的紫杉醇诱导的人 CCRF-CEM/paclitaxel 多药耐药细胞模型, 该模型具有一般肿瘤多药耐药细胞的生物学特点。

关键词: 紫杉醇; CCRF-CEM 细胞; 抗药性, 肿瘤; P 糖蛋白; 多药耐药相关蛋白质类; 肺癌耐药相关蛋白
中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2010)02-0134-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2010.02.010

肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)是指耐药肿瘤对结构和功能不相关的一定数量的其他化疗药物同时耐受的特殊现象^[1-3]。肿瘤 MDR 的发生机制十分复杂, 涉及肿瘤生长的微环境、细胞膜、线粒体和囊泡以及基因、蛋白质和信号传导等许多因素, 至今尚无有效防止和逆转肿瘤 MDR 的方法。近年来, 相继发现了以维拉帕米(verapamil)和环孢素 A(ciclosporin A)等为代表的第一代、以右维拉帕米(dexverapamil)等为代表的第二代、以 LY335979 和 VX-710 等为代表的第三代肿瘤 MDR 逆转药物, 但由于其作用靶标 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)普遍分布于人胃肠道、肾脏和血脑屏障等, 均未能成功应用于临床。因此, 深入研究肿瘤 MDR 的发生机制, 探索有效逆转肿瘤 MDR 的新靶标仍然十分必要。紫杉醇(paclitaxel)诱导的 MDR 肿瘤细胞系已有文献报道, 如 U-2OS 和 MCF-7 等^[4]。研究发现, 紫杉醇诱导的 MDR 肿瘤细胞模型与其他化疗药物诱导的 MDR 肿瘤细胞模型在生物学特点

方面存在着许多相似之处, 如 S 期细胞比例减少, 细胞增殖指数降低, 细胞凋亡率降低以及 MDR 相关蛋白表达水平升高等^[5-9]。因此, 本研究建立紫杉醇诱导的人急性 T 淋巴细胞白血病 MDR 肿瘤细胞模型——CCRF-CEM/paclitaxel 模型, 为深入研究肿瘤 MDR 发生机制及寻找有效防止和逆转肿瘤 MDR 的新靶标提供实验条件。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、试剂和仪器

CCRF-CEM 细胞由美国斯隆-凯特林癌症中心临床药理试验中心赞助。紫杉醇、柔红霉素(daunorubicin)和长春碱(vinblastin)购于 Sigma 公司, 实验前均用 DMSO 溶解, 配制所需浓度。胎牛血清购自 Biochrom AG 公司; RPMI 1640 培养基、小鼠抗人 P-gp、MDR 相关蛋白 1 (MDR-related protein 1, MRP1) 和肺癌耐药相关蛋白(lung cancer resistance-related protein, LRP)单克隆抗体、小鼠同型抗体 IgG₁ 和 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购于 Sigma 公司; 台盼蓝和 MTT 购自 Amresco 公司。CO₂ 培养箱: 美国 NUAIR America 公司; FACS Calibur 流式细胞仪: 美国 BD 公司; LSM510 META 共聚焦显微镜: 德国 Zeiss 公司。

作者简介: 朱金武, (1970 -), 男, 黑龙江省桦川县人, 博士后, 主要从事中药新药研发及肿瘤药理学研究。

通讯作者: 关勇彪, E-mail: GuanYB@hotmail.com, Tel: (010)68159974

1.2 紫杉醇诱导的 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞模型的建立

取液氮保存的 CCRF-CEM 细胞,于 37℃ 水浴快速解冻,用无血清的 RPMI 1640 培养液 $100 \times g$ 离心洗涤 2 次,每次 10 min。弃上清液,细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液混悬后,接种于培养瓶中,于 37℃,5% CO₂ 条件下培养。细胞复苏传代培养 2~3 代后,开始在亚致死浓度紫杉醇的刺激下传代培养。在接种细胞前,先在培养瓶中加入紫杉醇 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (约为 CCRF-CEM 细胞 $1/50 \text{ IC}_{50}$ 值),然后将细胞接种于培养瓶中,于 37℃,5% CO₂ 条件下培养。随着细胞耐药程度的增加,增加紫杉醇的浓度,基本保持在 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞 $1/50 \text{ IC}_{50}$ 值浓度水平。为了保证实验的顺利进行,培养一段时间的 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞及时冻存于液氮中,每次冻存前记录该批冻存细胞的耐药倍数或刺激培养用紫杉醇的浓度。每次刺激培养复苏前一次冻存的细胞,直至建立耐药倍数为 256.4 左右的 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞系,液氮中冻存备用。

1.3 细胞复苏和传代培养

取保存于液氮中的 CCRF-CEM 和 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞,按上述方法复苏、传代培养 2~3 代后,将培养 48 h 的细胞于 $100 \times g$ 离心 10 min,弃上清液,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液混悬后,接种于培养瓶中,于 37℃,5% CO₂ 条件下培养,CCRF-CEM/paclitaxel 细胞在接种前,培养基中加入紫杉醇 $0.032 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以维持细胞的耐药性^[10]。

1.4 细胞耐药性评价

分别收集培养 48 h 的 CCRF-CEM 和 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基混悬后,接种于 24 孔板中,每孔 $500 \mu\text{l}$ 密度为 $1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液,以第一列孔为对照组(加入 $2.0 \mu\text{l}$ DMSO),其余 5 列为不同浓度药物组,分别给以 $2 \mu\text{l}$ 不同浓度的药物。对 CCRF-CEM 细胞,紫杉醇终浓度为 0.000267,0.00267,0.0267,0.267 和 $2.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;柔红霉素终浓度为 0.00148,0.0072,0.037,0.184 和 $0.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;长春碱终浓度为 0.54,1.08,2.14,4.28 和 $8.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。CCRF-CEM/paclitaxel 细胞,紫杉醇终浓度为 0.0424,0.212,1.064,5.32 和 $26.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;柔红霉素终浓度为 0.00376,0.0368,0.184,0.92 和 $4.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;长春碱终浓度为 1.08,2.14,4.28,8.60 和 $17.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。37℃,5% CO₂ 条件下培养 48 h,合并每组 4 孔细胞混悬液,混匀后,用 0.4% 的台盼蓝染色,于显微镜下计数活细胞^[11]。实验重复 3 次,CCRF-

CEM/paclitaxel 细胞 IC_{50} 平均值与 CCRF-CEM 细胞 IC_{50} 平均值的比值即为 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对药物的耐药倍数。

1.5 细胞表面 P-gp 水平的测定

分别收集 2×10^6 CCRF-CEM 和 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞,用 pH 7.4 的 PBS 洗 2 次,用 2% 的甲醛溶液在室温下固定 10 min,用含有 0.1% 牛血清白蛋白和 0.01% 叠氮钠的 PBS 洗 2 次,将细胞混悬于含有 10% 兔血清的 PBS 中,加入小鼠抗人 P-gp 的单克隆抗体,阴性对照组加以同源抗体即小鼠的 IgG₁,在冰浴上孵育 1 h。冰浴后,细胞用 PBS 洗 2 次,与 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体在冰上共同孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次,用 1% 多聚甲醛固定,用流式细胞仪测定细胞的荧光强度,细胞表面 P-gp 的表达水平以单抗组细胞的几何荧光强度与同源抗体对照组平均几何荧光强度的比值表示^[12]。同时用激光共聚焦显微镜观察细胞表面荧光强度。

1.6 细胞总 P-gp, MRP1 和 LRP 表达的测定

分别收集 2×10^6 CCRF-CEM 和 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞,用 pH 7.4 的 PBS 洗 2 次,用 2% 的甲醛溶液在室温下固定 10 min,用含有 0.04% 皂角苷(saponin)、0.1% 牛血清白蛋白和 0.01% 叠氮钠的 PBS 洗 2 次,细胞混悬于含有 0.04% 皂角苷和 10% 兔血清的 PBS 中,分别加入小鼠抗人 P-gp, MRP1 和 LRP 的单克隆抗体,阴性对照组加以同源抗体即小鼠 IgG₁,在冰浴上孵育 1 h。冰浴后,细胞用含 0.04% 皂角苷的 PBS 洗 2 次,与 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体在冰上共同孵育 1 h,用含 0.04% 皂角苷的 PBS 洗 2 次,用不含皂角苷的 PBS 洗 1 次,然后用 1% 多聚甲醛固定,用流式细胞仪测定细胞的荧光强度,细胞总 P-gp, MRP1 和 LRP 的表达水平分别以各单抗组细胞的几何荧光强度与其同源抗体对照组的平均几何荧光强度的比值表示。

1.7 细胞周期分析

分别收集传代 48 h 的 CCRF-CEM 和 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞,用冰冷的 pH 7.4 的 PBS 洗涤 2 次,用 70% 的乙醇在冰上固定 2 h,然后于 4℃, $88 \times g$ 离心 10 min,细胞重新混悬于 PBS 中,加入 $100 \mu\text{l}$ 核酸酶 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 在室温下反应 30 min,加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碘化丙啶孵育 15 min,用流式细胞仪分析细胞周期和细胞凋亡率^[13]。

1.8 统计学分析

浓度-效应关系曲线作图采用 OriginPro 8 分析软件;用 Microsoft Office Excel 2003 软件进行线性回归分析;显著性分析采用 OriginPro 8 分析软件组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞的耐药性

化疗药物敏感的 CCRF-CEM 细胞在亚致死浓度的紫杉醇诱导下, 转变为紫杉醇耐受的 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞。实验结果表明, 紫杉醇抑制 CCRF-CEM 细胞存活的 IC_{50} 值为 $(5.42 \pm 1.45) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 经过紫杉醇刺激培养 90 代后, 紫杉醇抑制 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞存活的 IC_{50} 值上升为 $(1.39 \pm 0.61) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对紫杉醇的耐药倍数约为 256.4 倍(图 1)。CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对柔红霉素和长春碱也同时产生了耐药, 柔红霉素抑制 CCRF-CEM 细胞存活的 IC_{50} 值为 $(29.5 \pm 4.6) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 长春碱的 IC_{50} 值为 $(3.58 \pm 0.31) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 经过紫杉醇刺激培养 90 代后, 柔红霉素抑制 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞存活的 IC_{50} 值上升为 $(0.29 \pm 0.13) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 长春碱的 IC_{50} 值上升为 $(7.23 \pm 0.21) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对柔红霉素和长春碱的耐药倍数分别为 9.8 和 2.0 倍(图 2)。

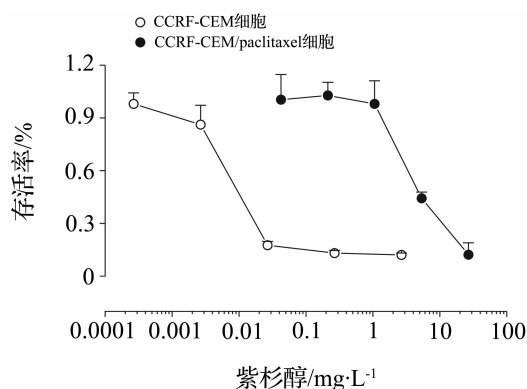


图 1 多药耐药细胞模型 CCRF-CEM/paclitaxel 和化疗药敏感的 CCRF-CEM 细胞对紫杉醇的耐药性。细胞培养 48 h, 紫杉醇抑制 CCRF-CEM/paclitaxel 和 CCRF-CEM 细胞存活的 IC_{50} 值分别为 $(1.39 \pm 0.61) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(5.42 \pm 1.45) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对紫杉醇的耐药倍数为 256.4 倍。 $\bar{x} \pm s, n=3$ 。

Fig. 1 Resistance of cancerous multidrug resistant cell model CCRF-CEM/paclitaxel and sensitive human leukemia cells CCRF-CEM to paclitaxel.

2.2 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞表面 P-gp 的表达

流式细胞仪测定结果表明, 与 CCRF-CEM 细胞比较, CCRF-CEM/paclitaxel 细胞表面 P-gp 表达水平升高, 几何荧光强度与同源抗体对照组平均几何荧光强度的比值为 30.1, CCRF-CEM 细胞几何荧光强度与同源抗体对照组平均几何荧光强度的比值为

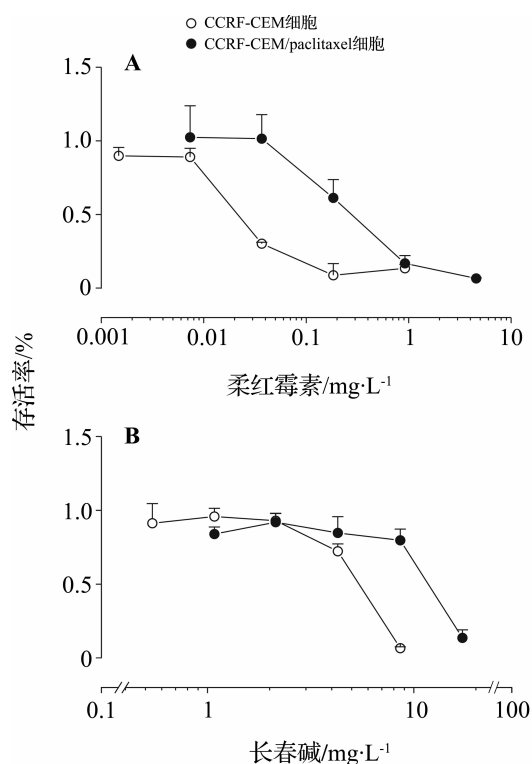


图 2 CCRF-CEM/paclitaxel 和 CCRF-CEM 细胞对柔红霉素(A)和长春碱(B)的交叉耐药性。细胞培养 48 h, 柔红霉素和长春碱抑制 CCRF-CEM 细胞存活的 IC_{50} 值分别为 $(29.5 \pm 4.6) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(3.58 \pm 0.31) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 抑制 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞存活的 IC_{50} 值分别为 (0.29 ± 0.13) 和 $(7.23 \pm 0.21) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对柔红霉素和长春碱的耐药倍数分别为 9.8 和 2.0 倍。 $\bar{x} \pm s, n=3$ 。

Fig. 2 Cross resistance of CCRF-CEM/paclitaxel and CCRF-CEM cells to daurorubicin (A) and vinblastin (B).

1.5, CCRF-CEM/paclitaxel 细胞表面 P-gp 表达水平比 CCRF-CEM 细胞升高了 18.8 倍。激光共聚焦显微镜观察的结果与流式细胞仪测定结果一致(图 3)。

2.3 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞总 P-gp, MRP1 和 LRP 蛋白表达的变化

P-gp, MRP1 和 LRP 蛋白在 CCRF-CEM/paclitaxel 和 CCRF-CEM 细胞均有表达, CCRF-CEM/paclitaxel 细胞 3 种蛋白表达水平均高于 CCRF-CEM 细胞, 与 CCRF-CEM 细胞比较, P-gp, MRP1 和 LRP 分别升高了 14.4, 2.1 和 1.2 倍(图 4 和图 5)。

2.4 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞周期和凋亡率的变化

与 CCRF-CEM 细胞比较, CCRF-CEM/paclitaxel 细胞 G_0/G_1 期细胞比例升高了 56.4%, S 期细胞比例减少了 50.7%; 细胞凋亡率显著降低, 约为 CCRF-CEM 细胞的 1/3(图 6 和表 1)。

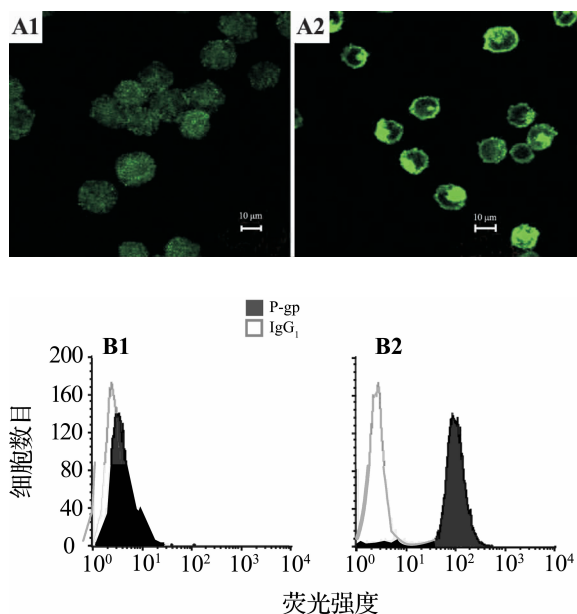


图 3 CCRF-CEM/paclitaxel 和 CCRF-CEM 细胞表面 P 糖蛋白 (P-gp) 的表达. A: 激光共聚焦显微镜测定结果; B: 流式细胞仪分析结果. A1 和 B1: CCRF-CEM 细胞; A2 和 B2: CCRF-CEM/paclitaxel 细胞.

Fig. 3 Expression of P-glycoprotein (P-gp) on surface of CCRF-CEM/paclitaxel and CCRF-CEM cells detected with confocal microscopy (A) and flow cytometry (B).

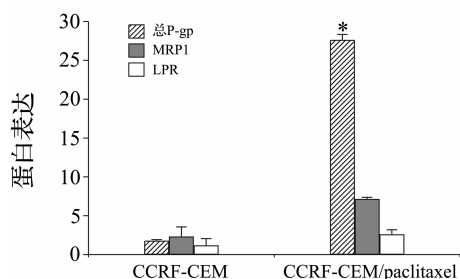


图 4 总 P-gp、多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 和肺癌耐药相关蛋白 (LRP) 在 CCRF-CEM/paclitaxel 和 CCRF-CEM 细胞的表达. 以各单抗组细胞的几何荧光强度与其同源抗体 IgG₁ 对照组平均几何荧光强度的比值表示细胞总 P-gp、MRP1 和 LRP 的表达水平. $\bar{x} \pm s, n=3$. * $P < 0.05$, 与 CCRF-CEM 细胞比较.

Fig. 4 Expressions of total P-gp, multidrug resistance-related protein 1 (MRP1) and lung cancer related protein (LRP) in CCRF-CEM/paclitaxel and CCRF-CEM cells detected with flow cytometry.

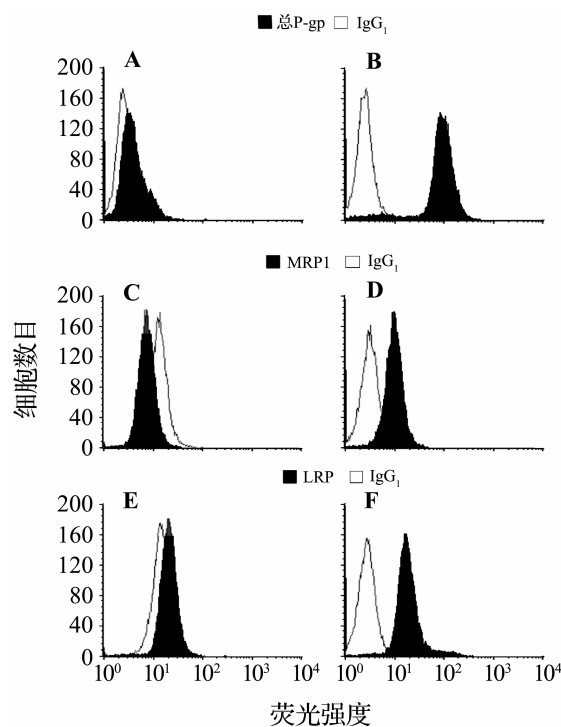


图 5 总 P-gp、MRP1 和 LRP 在 CCRF-CEM/paclitaxel 和 CCRF-CEM 细胞表达的代表性流式细胞仪检测结果. A, C 和 E: CCRF-CEM 细胞; B, D 和 F: CCRF-CEM/paclitaxel 细胞.

Fig. 5 Representative results of expressions of total P-gp, MRP1 and LRP in CCRF-CEM/paclitaxel and CCRF-CEM cells detected with flow cytometry.

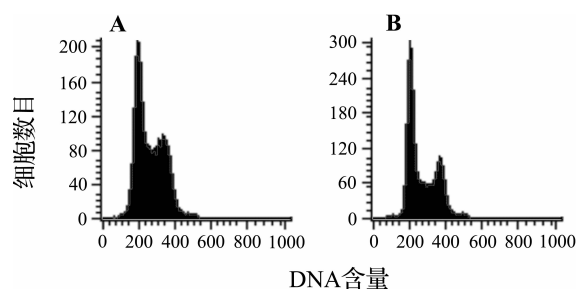


图 6 CCRF-CEM/paclitaxel (A) 和 CCRF-CEM (B) 细胞周期和凋亡率变化的代表性流式细胞仪检测结果.

Fig. 6 Representative results of difference of cell cycle and apoptosis between CCRF-CEM/paclitaxel (A) and CCRF-CEM (B) cells detected with flow cytometry.

表 1 CCRF-CEM/paclitaxel 和 CCRF-CEM 细胞周期和凋亡率的变化

Tab. 1 Difference of cell cycle and apoptosis between CCRF-CEM/paclitaxel and CCRF-CEM cells

细胞	G ₀ + G ₁ /%	G ₂ /%	S/%	凋亡率/%
CCRF-CEM	39.53 ± 1.24	12.19 ± 0.26	48.28 ± 1.22	7.82 ± 0.19
CCRF-CEM/paclitaxel	61.81 ± 1.49*	14.38 ± 1.04	23.80 ± 0.46*	2.47 ± 0.37*

$\bar{x} \pm s, n=3$. * $P < 0.05$, 与 CCRF-CEM 细胞比较.

3 讨论

本研究建立了紫杉醇诱导的悬浮 MDR 肿瘤细胞模型 CCRF-CEM/paclitaxel, 该模型基本符合肿瘤细胞 MDR 的特点, 对紫杉醇的耐药倍数为 256.4 倍, 对柔红霉素和长春碱的耐药倍数分别为 9.8 和 2.0 倍。紫杉醇是以稳定微管蛋白、抑制微管解聚和防止细胞分裂为特点的抗肿瘤药物, 柔红霉素是以抑制 DNA 和 RNA 合成为特点的抗生素类化疗药物, 长春碱是以抑制微管聚集、阻断纺锤体形成和诱导细胞凋亡的中药类抗肿瘤药物。CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对上述 3 种抗肿瘤药物同时产生了耐药性, 表明紫杉醇诱导的多药耐药细胞模型 CCRF-CEM/paclitaxel 建立成功。CCRF-CEM/paclitaxel 细胞的耐药倍数较高, 而且耐药性稳定, 细胞在紫杉醇 $0.032 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激传代过程中以及冻存前后, 其耐药性稳定维持在 (261.3 ± 11.4) 倍左右(未发表), 表明细胞在传代培养过程中和冻存前后均未发生耐药性丢失的现象。

与化疗药敏感的肿瘤细胞比较, 耐药肿瘤细胞的许多生物学特性均发生了改变, 如细胞周期、细胞凋亡以及某些功能蛋白表达水平等。以 P-gp 为代表的某些 ATP 结合盒(binding cassette)蛋白超家族成员以及某些转运蛋白分子表达水平升高是很多化疗药物诱导肿瘤产生多药耐药的直接原因^[14-15]。本研究发现, 与化疗药物敏感的 CCRF-CEM 细胞比较, 紫杉醇诱导的 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞周期发生了明显变化, G_0/G_1 期细胞比例显著增加, S 期细胞比例显著降低, 细胞增殖指数减小, 导致细胞对化疗药的敏感性降低; 同时, 细胞凋亡百分率显著减少, 约为化疗药物敏感细胞的 1/3。另外, 多药耐药相关蛋白 P-gp, MRP1 和 LRP 在 CCRF-CEM/paclitaxel 细胞中均有表达, 而且其表达水平均高于 CCRF-CEM 细胞。P-gp, MRP1 和 LRP 均为转运蛋白, 其在耐药细胞内表达水平升高, 可以导致化疗药物在细胞靶点的蓄积减少, 降低化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用, 尤其是 P-gp 在细胞表面表达水平的升高, 将直接导致化疗药物由细胞内到细胞外基质中的泵出, 减少化疗药物在细胞内的蓄积。

由此可见, 紫杉醇诱导的 CCRF-CEM/paclitaxel 肿瘤细胞模型与其他化疗药物诱导的多药耐药肿瘤细胞模型存在着许多共同特点。静息期细胞比例显著增加, S 期细胞比例显著减少, 对化疗药的敏感性降低; 凋亡细胞百分率显著减少; 多药耐药相关蛋白的表达水平升高, 尤其是细胞表面 P-gp 表达水平的升高, 致使化疗药物在细胞内的蓄积减少, 是

CCRF-CEM/paclitaxel 细胞对化疗药物产生多药耐药的重要因素。

参考文献:

- [1] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, **11**(4):265-283.
- [2] Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters [J]. *Nature*, 2007, **446**(7137):749-757.
- [3] Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance [J]. *Cell*, 2007, **128**(6):1037-1050.
- [4] Benderra Z, Trussardi A, Morjani H, Villa AM, Doglia SM, Manfait M. Regulation of cellular glutathione modulates nuclear accumulation of daunorubicin in human MCF7 cells overexpressing multidrug resistance associated protein[J]. *Eur J Cancer*, 2000, **36**(3):428-434.
- [5] Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily [J]. *Genome Res*, 2001, **11**(7):1156-1166.
- [6] Ferrao P, Sincoc P, Cole S, Ashman L. Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukaemia [J]. *Leuk Res*, 2001, **25**(5):395-405.
- [7] Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(16):9675-9682.
- [8] Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Monti E, Gariboldi M, Dolfini E, et al. Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2002, **16**(4):389-398.
- [9] Laurençot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH. Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 1997, **72**(6):1021-1026.
- [10] Mauritz R, Peters GJ, Priest DG, Assaraf YG, Drori S, Kathmann I, et al. Multiple mechanisms of resistance to methotrexate and novel antifolates in human CCRF-CEM leukemia cells and their implications for folate homeostasis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **63**(2):105-115.
- [11] Shah D, Naciri M, Clee P, Al-Rubeai M. Nucleo-counter - an efficient technique for the determination of

- cell number and viability in animal cell culture processes [J]. *Cytotechnology*, 2006, **51**(1):39-44.
- [12] Yamada M, Ariga T, Kawamura N, Yamaguchi K, Ohtsu M, Nelson DL, *et al.* Determination of carrier status for the Wiskott-Aldrich syndrome by flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome protein expression in peripheral blood mononuclear cells[J]. *J Immunol*, 2000, **165**(2):1119-1122.
- [13] Cortner J, Farnham PJ. Cell cycle analysis of Krox-20, c-fos, and JE expression in proliferating NIH3T3 fibroblasts[J]. *Cell Growth Differ*, 1991, **2**(9):465-473.
- [14] Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents[J]. *Pharmacol Ther*, 2000, **85**(3):217-229.
- [15] Parekh HK, Deng HB, Choudhary K, Houser SR, Simpkins H. Overexpression of sorcin, a calcium-binding protein, induces a low level of paclitaxel resistance in human ovarian and breast cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **63**(6):1149-1158.

Construction of cancerous multidrug resistant cell model induced by paclitaxel from human leukemia CCRF-CEM cells

ZHU Jin-wu, GUAN Yong-biao

(*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract: **OBJECTIVE** To construct a cancerous multidrug resistant cell model induced by paclitaxel and to evaluate its biological properties. **METHODS** Sub-lethal concentrations of paclitaxel ($1/50 IC_{50}$) were used to induce the sensitive human leukemia CCRF-CEM cells to become the MDR cells - CCRF-CEM/paclitaxel cells resistant to paclitaxel and cross resistant to daunorubicin and vinblastine simultaneously. CCRF-CEM/paclitaxel cells were stained with the corresponding monoclonal antibodies and second antibodies conjugated with FITC to determine the expression levels of cell surface P-glycoprotein (P-gp) and total P-gp, multidrug resistance-related protein 1 (MRP1) and lung cancer related protein (LRP) in the cells with flow cytometry. The cell cycle and natural apoptosis of CCRF-CEM/paclitaxel cells were investigated with flow cytometry at the same time. **RESULTS** After 90 generations of sub-culturing together with the sub-lethal concentrations of paclitaxel, CCRF-CEM/paclitaxel cells were induced to be 255.4-fold more resistant to paclitaxel, 8.8-fold more resistant to daunorubicin, and 1.0-fold more resistant to vinblastin simultaneously than CCRF-CEM cells. Compared with CCRF-CEM cells, the expression levels of surface P-gp of CCRF-CEM/paclitaxel cells increased 19.8-fold and the total P-gp, MRP1 and LRP increased 15.4-, 3.1- and 2.2-fold, respectively. The S-phase fraction of CCRF-CEM/paclitaxel cells was reduced from $(48.3 \pm 1.2)\%$ to $(23.8 \pm 0.5)\%$, and the apoptosis cells decreased from $(7.82 \pm 0.19)\%$ to $(2.47 \pm 0.37)\%$. **CONCLUSION** The cancerous multidrug resistant cell model CCRF-CEM/paclitaxel is successfully constructed, which has the general biological properties of cancerous multidrug resistant cells.

Key words: paclitaxel; CCRF-CEM cells; drug resistance, neoplasm; P-glycoprotein; multidrug resistance-associated proteins; lung cancer resistance-related protein

Corresponding author: GUAN Yong-biao, E-mail: GuanYB@hotmail.com, Tel: (010)68159974

(收稿日期: 2009-09-23 接受日期: 2010-02-04)

(本文编辑: 齐春会)