

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0455-06

胶质瘤耐药细胞株的建立及其继发性耐药相关基因的筛查

强兆艳¹, 汤 华^{2*}, 李 欣², 刘 民²(1. 天津医科大学基础医学院药理学教研室, 天津 300050; 2. 天津医科大学天津市生命科学研究中心, 天津 300050)

[摘 要] 目的: 构建胶质瘤耐替尼泊苷(teniposide, 又称 VM-26)细胞株, 利用基因芯片筛查该细胞株继发性耐药相关基因并证实其表达。方法: 选用人胶质瘤细胞系 SHG44 为靶细胞, 从低剂量起始逐步递增用药量(每 4 000 个细胞 VM-26 剂量由 0. 135 ng 至 4. 5 ng)诱导建立对 VM-26 耐药的细胞株, 绘制亲代细胞系和耐药细胞株增殖曲线比较两者倍增时间, 采用细胞毒性实验计算半数抑制浓度(IC₅₀)比较两者耐药程度的差异。应用人类 cDNA 表达谱芯片检测耐药和敏感细胞基因表达谱的变化, 筛查出与耐药有关的基因并经半定量 RT-PCR 验证。结果: 经过 72 代诱导培养, 建立了稳定耐药的细胞株 SHG44/VM-26, 耐药性是亲代细胞的 52. 6 倍; 耐药细胞倍增时间明显长于亲代细胞(25. 6 vs 48. 9 h); cDNA 芯片筛选出 11 个基因表达上调, 42 个基因表达下调; 半定量 RT-PCR 证实基因 *MDR1*、*NGFR*、*HSP22*、*CX IX*、*CDKN3* 和 *NADE* 的表达与基因芯片结果基本一致。结论: 成功建立胶质瘤耐替尼泊苷细胞株 SHG44/VM-26, 该细胞株的继发性耐药与基因 *MDR1*、*NGFR*、*HSP22* 的高表达和 *CX IX*、*CDKN3* 和 *NADE* 的低表达相关。

[关键词] 胶质瘤; 替尼泊苷; 耐药细胞株; cDNA 芯片; 耐药相关基因

[中图分类号] R730. 5; R739. 4 [文献标识码] A

Establishment of a Teniposide resistant glioma cell line and screening for the secondary drug-resistant genes

QIANG Zhao-yan¹, TANG Hua^{2*}, LI Xin², LIU Min²(1. Department of Pharmacology, Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300050, China; 2. Tianjin Life Science Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a Teniposide (also name as VM-26) resistant glioma cell line and to screen for the secondary drug-resistant genes of glioma cells by gene microarray. **Methods:** Glioma cell line SHG44 was successively exposed to increasing dose of VM-26 (VM-26 dose 0. 135→4. 5 ng for each 4 000 cells) to establish VM-26 resistant cell line. The growth curves of parent cells and VM-26 resistant cells were plotted to observe the doubling time of them. Cytotoxicity test was used to calculate the IC₅₀ of the parent and VM-26 resistant cells to compare the drug resistance of them. cDNA microarray was employed to identify differentially expressed genes between the parent and VM-26 resistant cells. The identified drug resistance-related genes were confirmed by RT-PCR. **Results:** Drug resistant cell line SHG44/VM-26 was successfully established after 72 generation of passaging; the IC₅₀ of SHG44/VM-26 cell was 52. 58 times that of parent cells. The doubling time of SHG44/VM-26 obviously longer than that of SHG44 cells(25. 6 vs 48. 9 h). cDNA microarray revealed 11 up-regulated genes and 42 down-regulated genes. Over expression of *MDR1*, *NGFR*, *HSP22* and low expression of *CX IX*, *CDKN3*, *NADE* were verified by semi-quantitative RT-PCR. **Conclusion:** We have successfully established VM-26-resistant cell line SHG44/VM-26; the secondary resistance of SHG44/VM-26 is associated with the over-expression of *MDR1*, *NGFR*, *HSP22* and low expression of *CX IX*, *CDKN3*, and *NADE* genes.

[Key words] glioma; Teniposide; drug resistance cell line; cDNA microarray; drug-resistant gene

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 455-460]

胶质瘤是最常见的脑肿瘤。化疗是治疗脑胶质瘤的重要方法之一, 但临床上相当一部分脑胶质瘤患者化疗效果不理想, 除胶质瘤原发性耐药外, 获得性耐药也是化疗失败的重要原因之一^[1]。90% 以上的胶质瘤死亡患者不同程度地与所患肿瘤的多药

[基金项目] 天津市高新技术项目 (No. 033182911)。Supported by the High Technology Program of Tianjin (No. 033182911)

[作者简介] 强兆艳(1973-), 女, 天津市人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤药理学方向的研究, E-mail: qzyss@ sina. com

* Corresponding author. E-mail: htang2002@ yahoo. com

耐药(multidrug resistance, MDR)性有关,其机制尚不清楚。建立化疗药物耐药细胞株是研究MDR机制的基础,对提高化疗疗效,从而提高患者生存质量和长期存活率具有重要意义。

目前通过诱导建立的胶质瘤耐药细胞株较少,常用的是对亚硝基脲类药物耐药的细胞株U251/BCNU^[2]。但是临床对胶质瘤的治疗药物种类很多,为了能从多方面全面探讨胶质瘤耐药的机制,本研究选用人恶性胶质母细胞瘤细胞系SHG44为靶细胞,诱导建立对替尼泊苷(teniposide, 又称VM-26)耐药的细胞株,应用人类cDNA表达谱芯片检测耐药和敏感的细胞基因表达的变化并进行验证,从而筛选出与耐药有关的基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

人胶质瘤细胞系SHG44由中国医学科学院血液学研究所提供。培养条件:MEM- α 完全培养液(含10%灭活FBS,青霉素100 U/ml,链霉素100 U/ml),37℃、5%CO₂孵箱培养。

主要试剂:MEM- α 培养液、胰蛋白酶、琼脂糖均购自GIBCO公司,小牛血清来源于中国医学科学院血液病研究所,MTT购自Genview公司,VM-26购自施贵宝公司,TRIzol Reagent为Invitrogen产品,基片为ArrayIt™ DNA Microarray Products SuperAmine Substrates产品,mirVana™ miRNA Isolation Kit为Ambion产品,MICROMAX™ TSA Labeling and Detection Kit为PerkinElmer产品,半定量RT-PCR所用试剂Oligo dT、5×RT-Buffer、DTT、dNTP、RNasin、M-MLV、Taq酶均购自Promega公司,全部PCR引物由北京三博远志生物公司合成。

1.2 SHG44/VM-26 耐药细胞株的建立

SHG44细胞消化后计数,VM-26对每4000个细胞用量从低剂量0.135 ng起始,作用72 h后更换新鲜含等量药物的培养液,继续培养至单层细胞达80%;消化传代后再以同等药量或小幅增加药量继续作用。逐步递增诱导至每4000个细胞VM-26剂量达4.5 ng。最终得到能够在每4000个细胞VM-26剂量达4.5 ng时稳定生长的人胶质瘤耐药细胞模型SHG44/VM-26。自开始诱导起共历时5个月,细胞共传27代建立此模型。

1.3 MTT法检测VM-26对肿瘤细胞的毒作用

实验前撤去耐药细胞模型中含药物的培养液,传代1次,待稳定生长后使用。消化后的细胞悬液以4.5×10⁴/ml接种96孔板。每孔加入90 μ l细胞

悬液及10 μ l不同质量浓度VM-26,使其终质量浓度分别为0.45,4.5,45,450,4500 ng/孔,每质量浓度设3个复孔;同时各设3孔细胞对照和空白对照,每孔加90 μ l肿瘤细胞悬液,再各加入10 μ l不含药物的无血清MEM- α 。各孔终体积为100 μ l,置37℃、5%CO₂孵箱培养4 h后,550×g离心5 min,去上清,每孔加入100 μ l DMSO终止反应并溶解蓝紫色甲赞颗粒,震荡混匀,酶标仪测波长为570 nm的各孔光密度值(D₅₇₀)。细胞增殖抑制率的计算:抑制率(%)=(细胞对照组D₅₇₀-试验组D₅₇₀)/(细胞对照组D₅₇₀-空白对照组D₅₇₀)×100%。

根据不同浓度梯度的抑制率拟合曲线,计算VM-26在两种细胞中的IC₅₀(半数抑制浓度)值,比较统计学差异。

1.4 细胞增殖曲线和群体倍增时间测定

调整细胞密度,以SHG44 3×10⁴/ml,SHG44/VM-26 9×10⁴/ml密度接种至24孔板,每孔1 ml,每种细胞接种21孔,接种后24 h开始计数,每隔24 h计数3孔细胞取均值,连续观察7 d。

1.5 细胞总RNA的提取和鉴定

5×10⁶个细胞加入1 ml Trizol室温作用5~10 min,每毫升细胞裂解物加入200 μ l预冷氯仿,颠倒充分混匀,室温下作用5 min;16000×g,4℃离心15 min;吸出上清至新的EP管中,加入预冷的异丙醇600 μ l,-40℃放置1 h;16000×g,4℃离心30 min,沉淀RNA;弃上清,加入1 ml 75%的乙醇,弹起沉淀,16000×g,4℃离10 min;弃上清,敞盖,室温静置5 min,每管加入20 μ l DEPC水溶解5 min;每管取出1 μ l溶解于9 μ l DEPC水中电泳;测定RNA的纯度与浓度。

1.6 耐药细胞株和亲代细胞株的cDNA芯片分析

实验所用的芯片由本室制备,探针购买于QIAGEN Operon公司,共含有7267个人类基因,包含凋亡相关基因、肿瘤相关基因、信号转导相关基因、肝酶代谢相关基因、细胞因子相关基因等5部分。使用SpotArray™ 24 Microarray Printing System将探针点样至玻片上,每个探针重复点样2次。

cDNA的合成和标记,芯片杂交和TSA检测及其后的数据分析均按照MICROMAX™ TSA标记和检测试剂盒说明进行。

1.7 半定量RT-PCR验证芯片分析的结果

本实验所有PCR引物及其复性温度、循环数及扩增长度见表1。部分基因例如HSP22和CA IX在正常脑组织和胶质瘤中表达量较低。出现耐药后表达量的改变与自身相比有明显改变,但与其他基因

相比还是偏低。所以 PCR 过程中只有增加循环数量才有所比较。

表 1 RT-PCR 引物、复性温度、循环数及扩增长度

Tab. 1 Reannealing temperature, cycle numbers, oligonucleotide primers and sizes of their RT-PCR products

Gene name	Primer	T _m (t/°C)	Cycles	Product length (bp)
MDR1	5' AAGAGATTGTGAGGGC 3'	58	30	290
	5' ATTCTGGATGGTGGAC 3'			
NGFR	5' GGCTCCAGAGCATGTGCG 3'	62	35	490
	5' CAGGGATGAGGTTGTGCG 3'			
HSP22	5' CTTCCCAGACGACTTGA 3'	52	40	256
	5' TTGCCAGACACCTCC 3'			
HDAC1	5' ATCGGTTAGGTTGCTTC 3'	56	35	403
	5' TTGTCAGGTCGTCTTC 3'			
CA IX	5' TGCTGTCTCGCTTGA 3'	62	40	448
	5' TCTGTGTCGCTTCTCA 3'			
NADE	5' CTTTGGGAGGAGGTGA 3'	54	38	215
	5' CATAAGGATACGCAGACA 3'			

PCR 反应结束后, 取各基因全部 PCR 产物 25 μ l 加上样缓冲液 2.5 μ l 混合, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以

UVP 凝胶扫描成像系统记录观察结果并拍照。

用 LabWorks4.0 image acquisition and analysis 软件对电泳结果进行定量分析。 β -actin 作为内参照基因, 基因相对表达量 = 各基因密度值/ β -actin 密度值 \times 100%。

1.8 统计学处理

使用 SPSS 11.5 统计学软件包进行统计分析, 亲代细胞和耐药细胞间基因的表达差异用各自基因表达量的比值表示, 并判断其倍数的升高或降低是否与芯片结果一致。

2 结果

2.1 VM-26 处理后胶质瘤细胞形态的变化

倒置显微镜下见亲代胶质瘤细胞为梭形, 排列紧密、大小均匀、边界清楚、贴壁生长(图 1 A、B); 在细胞悬液中首次加入一定量药物 24 h 后, 细胞贴壁不良, 未完全伸展(图 1 C、D); 部分细胞在加药后 48 h 贴壁, 约 20% 细胞死亡, 死亡细胞漂浮于培养液中(图 1 E、F)。大部分贴壁的细胞大小相似, 形态较为规则, 细胞轮廓清晰, 恢复增殖后上述变化消失, 细胞增殖至 80% 以上传代, 最后形成稳定的耐药细胞株。耐药细胞异形性不显著, 和亲代细胞株相比, 细胞边界更清楚, 不规则, 细胞体积减小, 呈细长梭形, 只有很少部分细胞变形并有巨细胞产生(图 1 G、H)。

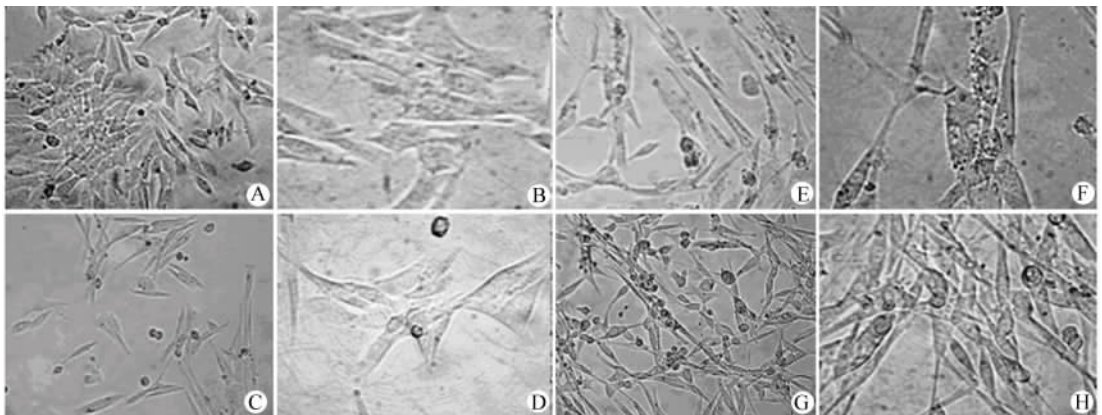


图 1 VM-26 处理后 SHG44 细胞形态的变化

Fig. 1 Morphological changes of SHG44 cells after VM-26 treatment

A, B: Parent cell line SHG44, A. \times 100, B. \times 250; C, D: 24 h after VM-26 was administrated, C. \times 100, D. \times 250;

E, F: 48 h after VM-26 was administrated, E. \times 100, F. \times 250; G, H: VM-26 resistant cell line SHG44/VM-26, G. \times 100, H. \times 250

2.2 耐药胶质瘤细胞对 VM-26 敏感性的改变

计算耐药细胞株与亲代细胞系不同浓度梯度 VM-26 作用 48 h 后的抑制率并拟合曲线, 计算 IC₅₀。结果 SHG44 的 IC₅₀ 为 0.99 μ g/ml,

SHG44/VM-26 的 IC₅₀ 为 52.06 μ g/ml, 耐药细胞株的 IC₅₀ 是亲代细胞株 IC₅₀ 的 52.6 倍, 两者之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 细胞增殖曲线和群体倍增时间测定

亲代细胞 SHG44 接种数量为 3.0×10^4 /ml, 接种后第 3 天进入对数生长期, 倍增时间为 25.6 h; 耐药细胞 SHG44/VM-26 则生长减缓, 第 4 天细胞开始进入对数生长期, 倍增时间为 48.9 h (图 2)。

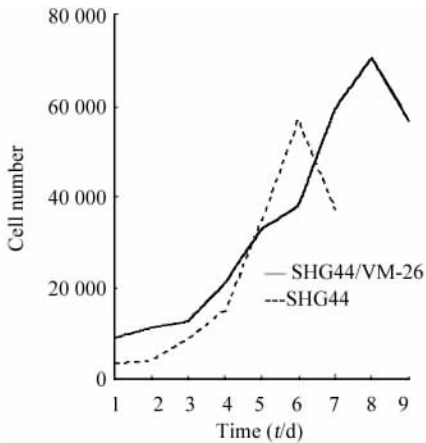


图 2 接种后 SHG44 与 SHG44/VM-26 细胞增殖曲线

Fig. 2 Growth curves of SHG44 and SHG44/VM-26 cells

The curve of SHG44/VM-26 cells rise up slowly. The doubling time of SHG44 cells is 25.6 h and that of SHG44/VM-26 is 48.9 h

2.4 芯片杂交筛查表达差异的基因

点样及芯片处理后, 采用共聚焦荧光扫描仪对芯片进行 Cy5 荧光扫描, 测定背景值。结果提示芯片基因点清晰, 没有基因漏点、重迭、以及不正常荧光的情况, 各芯片的背景值均匀, 符合要求。芯片杂交后, 各芯片均清晰、均匀, 无明显的彗星状拖尾现象, 背景值均匀, 无局部信号过强或过弱的情况, 基因表达芯片的扫描图像、杂交结果可靠。

通过比较基因表达, 发现耐药细胞株和亲代细胞系的基因相比存在较大的差异。以 $Cy3:Cy5 > 5$ 为标准, 共筛选出有表达差异的基因 53 个, 其中表达上调的基因 11 个, 表达下调的基因 42 个(表 2、表 3)。分析具有表达差异的基因, 大致可以分为 4 组, 包括人类肿瘤、凋亡、信号转导、肝酶相关的基因。

2.5 基因芯片结果的验证

半定量 RT-PCR 产物经电泳检测后, 6 个上调和下调的基因在亲代和耐药细胞中均能扩增出位置正确的条带和 β -actin 条带, *MDR1*、*NGFR*、*HSP22* 在耐药细胞中的表达均高于亲代细胞; *CA IX*、*CDKN3* 和 *NADE* 在耐药细胞中的表达均低于亲代细胞(图 3)。

3 讨论

诱导起始阶段 VM-26 用量每 4 000 个细胞为 0.135 ng, 诱导期间始终保持细胞培养液中含有一

定浓度的药物。在某个药物浓度, 待细胞连续传代后生长稳定再继续增加药物浓度, 如果增加药量后细胞死亡过多, 则撤回到上一个诱导浓度, 待完全稳定后再增加用药量。本研究建立的耐药细胞模型其耐药倍数是亲代细胞的 52.58 倍, 属于高耐药模型。与亲代细胞相比, 耐药细胞形态变化明显, 生长速度减慢, 倍增时间延长, 与某些研究结果一致^[3]。

表 2 耐药细胞系 SHG44/VM-26 表达上调的基因
Tab. 2 Overexpressed genes in drug-resistant SHG44/VM-26 cells

Gene No.	Name	Function
Multiple of overexpression >10		
NM_000927	<i>MDR1</i>	Multidrug resistance
NM_001673	<i>ASNS</i>	Signal transduction
NM_002507	<i>NGFR</i>	Signal transduction
Multiple of overexpression >5		
NM_001167	<i>AP3B</i>	Apoptosis
NM_012153	<i>ESE3</i>	Carcinogenesis
NM_016292	<i>TRAP1</i>	Molecular chaperones
NM_004488	<i>GP5</i>	Signal transduction
NM_003413	<i>ZIC3</i>	Signal transduction
NM_004182	<i>UXT</i>	Carcinogenesis
NM_006773	<i>DDX18</i>	Signal transduction
NM_014365	<i>HSP22</i>	Molecular chaperones

为了探讨与胶质瘤化疗耐药性密切相关的基因表达特征, 本研究应用 7 267 个人类基因的芯片比较耐药细胞系 SHG44/VM-26 和亲代 SHG44 细胞系基因表达谱的变化。耐药细胞系和敏感细胞系相比, 表达差异具有显著性意义的基因, 可以分为 4 组, 包括人类肿瘤、凋亡、信号转导、肝酶相关基因。半定量 RT-PCR 证实被选的 6 个基因在耐药细胞和亲代细胞中的表达趋势与芯片结果一致。

MDR1 是第一个确定引起肿瘤细胞多药耐药现象的人类 ABC 转运载体, 使细胞能对化疗药物产生耐受。该转运载体有广泛的特异性底物^[46], 胃肠道和脑毛细血管上皮细胞中该基因过表达会影响很多口服药物的吸收和进入中枢神经系统^[4]。在大脑微血管腔侧膜的 Pgp 既是药物进入的屏障, 又是药物外排的泵, 是药物进入中枢神经系统的关键^[7]; 另外, Pgp 还有可能参与炎症过程^[8]和免疫调节^[9]

表3 耐药细胞系 SHG44/VM-26 表达下调的基因

Tab. 3 Down-regulated genes in drug-resistant SHG44/VM-26 cells

Gene No.	Name	Function
Multiple of downexpression > 10		
NM_001214	<i>C16orf3</i>	Open reading frame
NM_020153	<i>C11orf60</i>	Open reading frame
NM_003442	<i>ZNF143</i>	Signal transduction
NM_058004	<i>PIK4CA</i>	Signal transduction
NM_001424	<i>EMP2</i>	Signal transduction
NM_000487	<i>ARSA</i>	Enzyme
NM_004914	<i>HD1</i>	Enzyme
NM_033018	<i>PCTAIRE</i>	Enzyme
NM_003244	<i>TGIF1</i>	Signal transduction
NM_014002	<i>IKBKE</i>	Signal transduction
NM_001216	<i>CA IX</i>	Carcinogenesis
NM_005572	<i>FPL</i>	Signal transduction
AK055579	<i>FOSL2</i>	Carcinogenesis
NM_005192	<i>CDKN3</i>	Cell cycle
NM_014380	<i>NADE</i>	Apoptosis
Multiple of downexpression > 5		
NM_005176	<i>ATP5G2</i>	Enzyme
NM_004530	<i>MMP2</i>	Enzyme
NM_000988	<i>RPL27</i>	Ribosome
NM_002317	<i>LOX</i>	Inhibit tumor
NM_001221	<i>CAMKD</i>	Enzyme
NM_001155	<i>ANX6</i>	Signal transduction
NM_002708	<i>PPP1CA</i>	Cell differentiation
NM_003331	<i>TYK2</i>	Enzyme
NM_012294	<i>GFR</i>	Signal transduction
NM_004462	<i>FDFT1</i>	Enzyme
BC008061	<i>SLC25A1</i>	Carrier
NM_000772	<i>CYP2C18</i>	Enzyme
NM_003992	<i>CLK3</i>	Enzyme
NM_002890	<i>RASA1</i>	Cell differentiation
NM_000064	<i>C3</i>	Complement
NM_001792	<i>CDH2</i>	Cell differentiation
NM_003043	<i>SLC6A6</i>	Signal transduction
NM_006058	<i>TNIP1</i>	Signal transduction
NM_000964	<i>RARA</i>	Signal transduction
NM_018946	<i>NANS</i>	Enzyme
AK025736	<i>HMGCS1</i>	Enzyme
NM_001069	<i>TUBB2A</i>	Tubulin
AL008639	<i>POGK</i>	Signal transduction
BC010106	<i>CS</i>	Enzyme
U07139	<i>CACNB3</i>	Voltage-dependent calcium channel
NM_001013	<i>RPS9</i>	Carcinogenesis

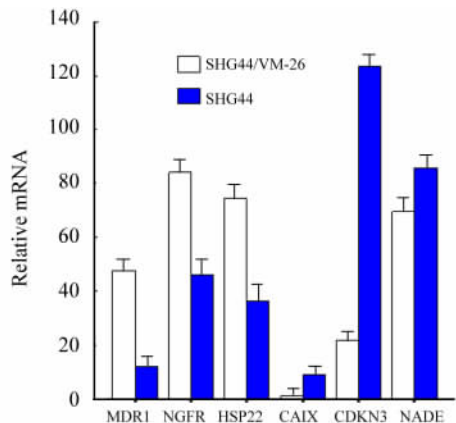


图3 *MDR1*、*NGFR*、*HSP22*、*CA IX*、*CKKN3* 及 *NADA* 在 SHG44 和耐药细胞 SHG44/VM-26 中的表达
Fig. 3 Expression of *MDR1*, *NGFR*, *HSP22*, *CA IX*, *CKKN3* and *NADA* in SHG44 and SHG44/VM-26 cells

等,但关于这些功能目前还未十分明了。本研究诱导的耐药细胞系能高表达该基因至少说明了两个问题:一是耐药细胞系的建立是成功的,不但细胞的增殖特征和形态等指标发生了改变,基因的表达也有变化;而且,用于分析基因表达的芯片系统也是稳定的,增加了其他一些没有验证的基因表达的可信性。

Hsp22 属于小热休克蛋白(sHsps),主要在骨骼肌和平滑肌中表达,脑组织中也有表达^[10]。多个研究认为 *HSP22* 在细胞抵抗氧化损伤的保护机制中起关键性作用^[11-12]。本研究中发现基因 *Hsp22* 在耐药细胞系中高表达,其表达量是亲代细胞的 2.06 倍,耐药细胞的倍增时间要长于亲代细胞,也就是细胞的增殖周期偏长,衰老的速度减慢。如果 *Hsp22* 确实与延缓衰老有关,化疗药物也是一种外源性化合物,那么很有可能是细胞受到化疗药物的作用后,使得 *Hsp22* 高表达,细胞的衰老减缓,倍增时间加长;但该现象是否与耐药的形成有关尚不得而知,而且,如果长时间撤掉药物,*Hsp22* 的表达和倍增时间有无明显的改变还需要进一步观察。

CA IX 是由酸性氨基酸组成的跨膜糖蛋白,在调节细胞增殖和肿瘤形成中具有潜在作用。尽管目前不认为 *CA IX* 本身是诱发肿瘤的因素,但可以引起胃黏膜腺体的萎缩,而萎缩则被认为是胃肿瘤发生前的病变^[13]。正常脑组织 *CA IX* 微量表达,肿瘤组织中随着恶性程度的升高,两者的表达上调^[14]。*CA IX* 在恶性程度高的弥漫性浸润的星形胶质瘤中普遍表达,是该类肿瘤预

后不良的生物学指标,也可能是星形胶质瘤治疗的靶分子^[15]。至今尚未发现有关 *CA IX* 和肿瘤耐药间关系的研究,本研究中亲代细胞 *CA IX* 的表达量明显低于耐药细胞株。根据上述文献,正常的脑组织中 *CA IX* 微量表达,肿瘤组织中随着恶性程度的提高,*CA IX* 表达上调,推论在耐药细胞中其表达也应上调,甚至表达量更高。但是本研究的结果与之相反,由于没有类似的文献作为参考,所以只能对 *CA IX* 与肿瘤耐药的关系下一个暂时性的结论,认为在耐药的肿瘤细胞中 *CA IX* 的表达是下调的,今后应从 *CA IX* 功能研究的角度出发,进一步探讨两者之间的关系。

多数抗肿瘤药物是通过断裂 DNA 而引起肿瘤细胞死亡,但同时也激活了肿瘤细胞的 *chk* 系统,使细胞阻滞在不同周期,以获得时间去修复断裂的 DNA,从而降低药物的疗效。本研究中 *CDKN3* 在耐药细胞中的表达明显降低,亲代细胞表达量是其 5.68 倍,细胞的增殖表现为倍增时间的增加。

NGFR 为与神经营养因子结合的跨膜 T 型蛋白,作为独立受体,具有自主信号传导途径,又可与高亲和力(*Trk*)受体结合形成受体复合物调节其与神经营养因子的结合力和信号传导,另外还有介导凋亡的功能。在本研究中,*NGFR* 在耐药细胞中高表达,是亲代细胞的 1.81 倍,虽然和另外两个表达上调的基因相比,其上调倍数最少,但基因芯片结果却显示该基因的上调倍数平均为 21.73 倍,是所有上调基因中上调倍数最高的。而且该基因功能复杂,有多种作用途径,究竟是何种机制使其在耐药细胞中高表达,尚需进一步研究。

关于 *HADE* 基因的研究不多见,有研究用基因芯片筛选与胶质瘤恶性程度相关的基因,结果显示该基因的表达与胶质瘤的恶性程度有关,*NADE* 表达降低,胶质瘤的恶性程度升高,但并没有进一步的研究进行证实。本研究中,半定量 RT-PCR 的结果认为耐药细胞中该基因的表达少于亲代细胞,与芯片分析的结果一致,但差异不大,为 0.81 倍,所以究竟是否存在差异尚有争论。

本研究建立了耐 VM-26 的胶质瘤细胞模型,并在该细胞中筛查出继发性耐药基因 53 个,为进一步研究肿瘤耐药性的基因机制奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Kang HC, Kim IJ, Park JH, *et al.* Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1pt1): 272-284.
- [2] 金 澎, 张庆林, 刘福生, 等. MGMT 介导的人脑胶质瘤耐药细胞系的建立 [J]. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(6): 596-600.
- [3] 王 其, 陈孝平. 人肝癌 HepG2 多药耐药细胞系的部分生物学性状研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(5): 538-540.
- [4] Lin JH. How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake [J]? *Drugs Today (Barc)*, 2004, 40(1): 5-22.
- [5] Fromm MF. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans [J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(Suppl 2): 6-9.
- [6] Sun H, Dai H, Shaik N, *et al.* Drug efflux transporters in the CNS [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(1): 83-105.
- [7] Begley DJ. ABC transporters and the blood-brain barrier [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(12): 1295-1312.
- [8] McRae MP, Brouwer KL, Kashuba AD. Cytokine regulation of P-glycoprotein [J]. *Drug Metab Rev*, 2003, 35(1): 19-33.
- [9] Richaud-Patin Y, Soto-Vega E, Jakez-Ocampo J, *et al.* P-glycoprotein in autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2004, 3(3): 188-192.
- [10] Chowdary TK, Raman B, Ramakrishna T, *et al.* Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity [J]. *Biochem J*, 2004, 381(pt 2): 379-387.
- [11] Morrow G, Samson M, Michaud S, *et al.* Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress [J]. *FASEB J*, 2004, 18(3): 598-599.
- [12] Morrow G, Battistini S, Zhang P, *et al.* Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43382-43385.
- [13] Leppilampi M, Karttunen TJ, Kivela J, *et al.* Gastric pit cell hyperplasia and glandular atrophy in carbonic anhydrase IX knockout mice: studies on two strains C57/BL6 and BALB/C [J]. *Transgenic Res*, 2005, 14(5): 655-663.
- [14] Proescholdt MA, Mayer C, Kubitzka M, *et al.* Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors [J]. *Neuro Oncol*, 2005, 7(4): 465-475.
- [15] Haapasalo JA, Nordfors KM, Hilvo M, *et al.* Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2): 473-477.

[收稿日期] 2007 - 08 - 09

[修回日期] 2007 - 09 - 20

[本文编辑] 郁晓路