

胃肠道间质瘤伊马替尼耐药细胞株的建立及细胞凋亡的实验研究

顾彬彬 叶丽萍 方从诚 王 俊 王 超 吴坚芬

摘 要 **目的** 体外构建胃肠道间质瘤耐药细胞株 GIST-882-IM, 鉴定其生物学特性。**方法** 采用首剂大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方法诱导胃肠道间质瘤细胞 GIST-882 对 Imatinib 耐药, 建立耐药细胞株, CCK8 法绘制细胞生长曲线, 计算细胞的倍增时间及半抑制浓度 IC_{50} , 流式细胞仪检测 GIST-882 及耐药株 GIST-882-IM 细胞凋亡及细胞周期。**结果** 耐药株 GIST-882-IM 的倍增时间为 $58.95 \pm 1.56h$, 高于细胞株 GIST-882 $49.49 \pm 0.69h$, GIST-882-IM $IC_{50} = 1.869 \pm 0.103 \mu mol$, GIST-882 $IC_{50} = 0.054 \pm 0.001 \mu mol$, 其耐药指数为 34.62 ($P < 0.01$)。耐药细胞株 GIST-882-IM 相对于 GIST-882, 凋亡受到抑制, 24、48、72h 其细胞凋亡率分别为 $1.97\% \pm 0.38\%$ 、 $2.87\% \pm 0.38\%$ 、 $4.40\% \pm 0.36\%$, GIST-882 凋亡率分别为 $6.07\% \pm 0.96\%$ 、 $11.17\% \pm 0.64\%$ 、 $16.97\% \pm 0.12\%$ 。细胞周期分析, 耐药细胞株的 G_0/G_1 期增加, S 期、 G_2/M 期减少。**结论** 成功构建 GIST882 Imatinib 耐药细胞株, 耐药细胞与非耐药细胞的生物学特性不同。这为下一步研究伊马替尼耐药机制和筛选伊马替尼耐药的替代靶向药物奠定基础。

关键词 耐药细胞株 细胞生长曲线 耐药指数 细胞凋亡

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.030

Establishment and Apoptosis of an Imatinib Resistant Cell Line of Gastrointestinal Stromal Tumor. Gu Binbin, Ye Liping, Fang Congcheng, et al. Department of Gastroenterology, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** To establish the imatinib-resistant gastrointestinal stromal cell line (GIST-882-IM) and explore its biological characteristics. **Methods** Imatinib-resistant cell line (GIST-882-IM) was established by the high concentration Imatinib. The cell growth curve, doubling time and IC_{50} was calculated by CCK-8 assay. The apoptosis and the cell cycle of GIST-882, GIST-882-IM was tested by flow cytometry. **Results** The doubling time of GIST-882-IM and GIST-882 was $58.95 \pm 1.56h$ and $49.49 \pm 0.69h$ respectively ($P < 0.01$). IC_{50} for GIST-882-IM and GIST-882 was $IC_{50} = 1.869 \pm 0.103 \mu mol$ and $0.054 \pm 0.001 \mu mol$ respectively ($P < 0.01$). The resistance of GIST-882-IM to Imatinib was 34.62 fold of GIST-882. Compared with GIST-882, apoptosis of the GIST-882-IM was inhibited. The apoptosis rate of GIST-882-IM in 24, 48, 72h was $1.97\% \pm 0.38\%$, $2.87\% \pm 0.38\%$, $4.40\% \pm 0.36\%$ while the GIST-882 was $6.07\% \pm 0.96\%$, $11.17\% \pm 0.64\%$, $16.97\% \pm 0.12\%$ respectively ($P < 0.01$). The cell numbers of G_0/G_1 phase increased while decreased in S and G_2/M phase in GIST-882-IM cell. **Conclusion** The Imatinib-resistant gastrointestinal stromal cell line GIST-882-IM was successful established. The GIST-882 and GIST-882-IM cells were different in biological characteristics. The GIST-882-IM cell will be used to study the mechanism of Imatinib resistance in GIST and search another targeted drug to eliminate the drug resistance.

Key words Drug-resistant cell line; Cell growth curve; Resistance; Apoptosis

胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 是胃肠道最常见的间叶组织源性肿瘤, 具有复发和转移的恶性分化潜能^[1, 2]。手术切除是 GIST 的主要手段, 而分子靶向药物主要用于复发、转移率较高的 GIST 的辅助治疗^[3, 4]。伊马替尼 (Imatinib) 为 GIST 治疗的靶向治疗一线药物, 使部分 GIST 患者获

得完全或部分缓解, 然而约 80% 的患者在治疗 1~3 年后出现了继发性耐药^[5, 6]。因此, 对其耐药机制的研究以及寻找新的干预靶点极为重要。本研究旨在建立伊马替尼耐药的胃肠间质瘤细胞株, 为探寻伊马替尼耐药的替代靶向药物的研究提供基础。

材料与方法

1. 材料: GIST-882 细胞由杭州赫贝生物科技提供, Imatinib 购自美国 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, CCK8 试剂盒购自

基金项目: 浙江省台州市科技计划项目 (131ky13)

作者单位: 317000 台州医院消化内科

通讯作者: 叶丽萍, 电子信箱: yelp@enzemed.com

日本同仁化学社;其余试剂均为国产分析纯。

2. 细胞培养: GIST-882 培养于含 15% 血清的 RPMI 1640 培养基, 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

3. 耐药细胞株的筛选: 采用首次大剂量冲击和逐步增加剂量结合的方法筛选耐药株^[7]。待 GIST-882 细胞进入对数生长期后更换含有 Imatinib 的培养基, 以 0.5 μmol 为起始浓度, 48h 后改为正常培养基, 待细胞正常生长稳定传代后, 再逐步增加 Imatinib 药物浓度, 重复上述步骤部分, 直至细胞能在 5 μmol 浓度下稳定生长和传代。

4. 药物敏感度检测: 取处于对数期的 GIST-882 和 GIST-882 Imatinib 耐药株细胞 (GIST-882-IM), 用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化细胞, 1500r/min 离心 5min, 计数板下计数, 铺 96 孔板, 两种细胞每孔均加入 8×10^3 个细胞, 放入培养箱中静置 24h。细胞贴壁 24h 后, 更换为含不同浓度的药物继续培养, 其药物浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10、100 μmol。每孔加入 100 μl 上述不同浓度的药物, 培养箱中作用 48h。

5. CCK8 检测细胞活力: 药物作用 48h 后, 吸含药培养基, 每孔加入含 10 μl CCK8 的 RPMI 1640 检测液, 设置空白对照孔, 37℃ 避光反应 2h, 450nm 处读取各孔 A 值, 计算抑制率和 50% 抑制浓度 (IC₅₀)。实验结果按下式计算: 细胞抑制率 (%) = (不加药组 A 值 - 实验组 A 值 / 不加药组 A 值) × 100%。

6. 测定细胞生长曲线并计算倍增时间: 取 GIST-882 和 GIST-882-IM 细胞对数生长期的细胞, 以 8×10^9 /ml 分别接种在 96 孔板, 间隔 24 小时取 5 个复孔, 进行细胞计数, 取平均值, 连续计数 7 天, 以培养时间为横轴, 细胞计数为纵轴, 绘制出细胞的生长曲线, 计算细胞倍增时间。

7. 细胞凋亡检测: 取正常培养的处于对数期的 GIST-882 和耐药株 GIST-882-IM 细胞, 铺 6 孔板, 两种细胞每孔均加入 2×10^5 个细胞, 放入培养箱中静置 24h 后, 加入浓度为 0.05 μmol Imatinib, 作用 24、48 和 72h, 离心收集细胞, 流式细胞仪进行细胞凋亡检测。流式检测细胞凋亡共分为 4 个象限: Q1-UL (坏死细胞和碎片), Q1-UR (晚期凋亡细胞和坏死细胞), Q1-LL (正常细胞), Q1-LR (早期凋亡细胞, 可被 CCK8 检测); 以 Q1-UR 和 Q1-LR 两象限之和统计为凋亡率。

8. 细胞周期检测: 各取 1×10^6 对数生长期的

GIST-882、GIST-882-IM 细胞, 磷酸盐缓冲液 PBS 洗 2 次, 重悬 70% 冷乙醇固定过夜, PBS 洗 2 次, 加入 100 μg/ml RNA 酶作用 30min, 100 μg/ml 碘化丙啶 PI 避光孵育 30min, 置流式细胞仪分析细胞周期比例。

9. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞生长曲线及增殖速度的变化: 图 1 为细胞的生长曲线, 相比于 GIST-882 细胞株, 耐药株 GIST-882-IM 细胞的增殖能力减弱。根据生长曲线计算细胞的倍增时间, GIST-882 细胞株的倍增时间为 49.49 ± 0.69 h, 耐药株 GIST-882-IM 细胞的倍增时间为 58.95 ± 1.56 h, GIST-882-IM 的倍增时间延长, 表明其增殖能力减弱, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。

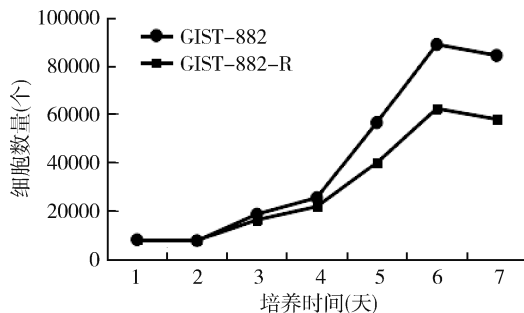


图 1 细胞生长曲线图

2. 药物敏感度的变化: Imatinib 对 GIST-882 及 GIST-882-IM 的作用结果如图 2、图 3。根据公式, 计算出半抑制浓度 IC₅₀, 结果是 GIST-882、GIST-882-IM 对 Imatinib 的 IC₅₀ 显著升高, IC₅₀ 分别为 1.869 ± 0.103 μmol 和 0.054 ± 0.001 μmol, 耐药指数为 34.62, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

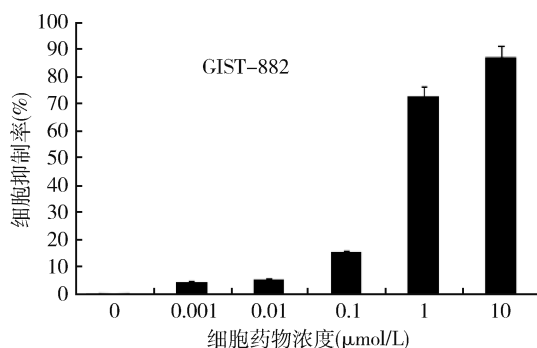


图 2 Imatinib 作用 GIST-882 细胞株 48h 后各组的抑制率

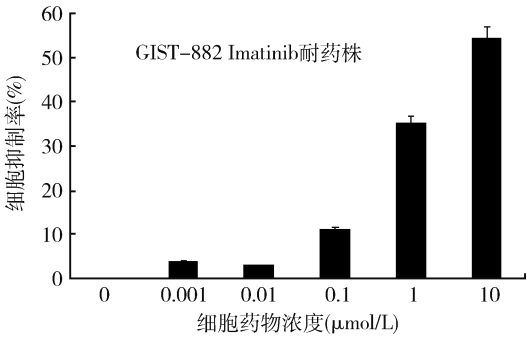


图3 Imatinib 作用 GIST - 882 - IM 细胞株 48h 后各组的抑制率

3. 细胞凋亡检测: Imatinib 作用细胞株 24、48、72h, GIST - 882 和 GIST - 882 - IM 的细胞凋亡率分别为 $1.97\% \pm 0.38\%$ 、 $2.87\% \pm 0.38\%$ 、 $4.40\% \pm 0.36\%$ 、 $6.07\% \pm 0.96\%$ 、 $11.17\% \pm 0.64\%$ 、 $16.97\% \pm 0.12\%$, 细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4、图 5、表 1)。

4. 细胞周期的变化: 与 GIST - 882 细胞相比, GIST - 882 - IM 细胞, 其 G_0/G_1 期比例增加, S 期、 G_2/M 期比例减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

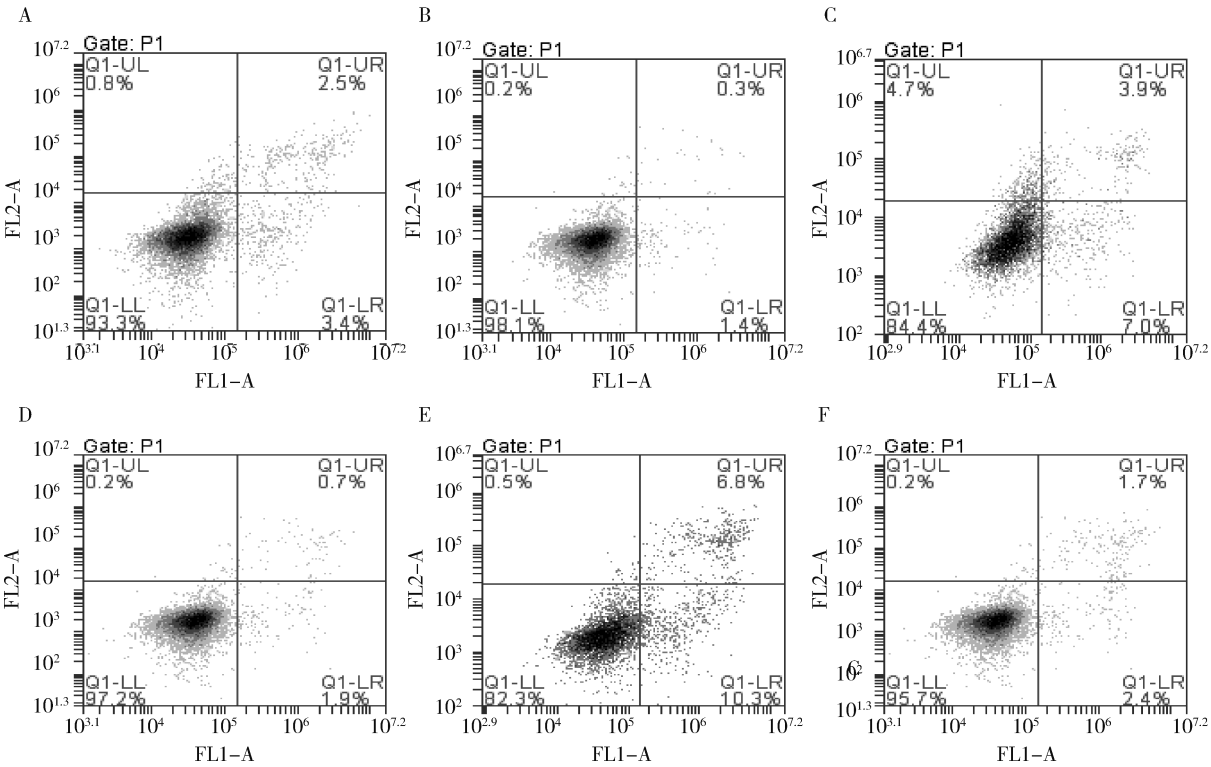


图4 伊马替尼对 GIST - 882 及 GIST - 882 - IM 耐药株细胞凋亡的影响
A. GIST - 882 - 24h; B. GIST - 882 - IM - 24h; C. GIST - 882 - 48h; D. GIST - 882 - IM - 48h; E. GIST - 882 - 72h; F. GIST - 882 - IM - 72h

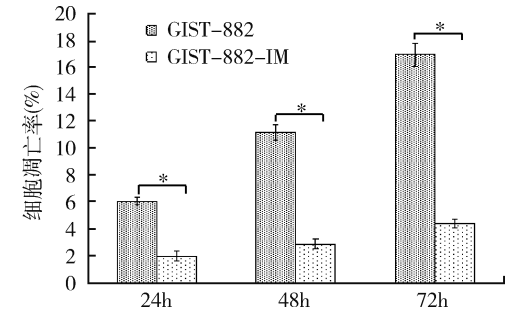


图5 伊马替尼对 GIST - 882 及 GIST - 882 - IM 细胞凋亡的影响

* $P < 0.01$

表1 伊马替尼对 GIST - 882 及 GIST - 882 - IM 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

细胞类别	凋亡率		
	24h	48h	72h
GIST - 882	6.07 ± 0.96	11.17 ± 0.64	16.97 ± 0.12
GIST - 882 - IM	1.97 ± 0.38	2.87 ± 0.38	4.40 ± 0.36

表2 GIST - 882 与 GIST - 882 - IM 细胞周期的分布 (%)

细胞类别	细胞周期		
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
GIST - 882	60.97	30.35	8.68
GIST - 882 - IM	68.32	25.82	5.68

讨 论

胃肠间质瘤的治疗方法主要为手术切除和分子靶向治疗^[2,8]。伊马替尼是转移复发不可切除的胃肠间质瘤的标准一线治疗药物,可使肿瘤降期、缩小手术范围和降低风险,显著改善中、高危 GISTs 患者的预后^[9]。然而随诊伊马替尼的应用,其耐药问题日益突出,约 20% 患者发生原发性,50% 患者出现继发性耐药^[10]。本研究旨在构建 GIST *matinib* 耐药细胞株,探讨其生物学特征,为进一步研究 *Imatinib* 耐药机制以及探寻替代的分子靶向药物提供研究基础。

目前体外建立耐药细胞株的方法主要为大剂量药物冲击法、药物浓度递增法、药物浓度递增与大剂量药物冲击相结合的方法。本研究应用药物浓度递增与大剂量药物冲击相结合的方法,成功诱导对 *Imatinib* 耐药的细胞株 GIST - 882 - IM,并且能稳定生长及传代,该细胞的 IC_{50} 为 $1.869 \mu\text{mol}$,耐药指数为 34.62,属于高度耐药。

细胞的生长曲线是反映细胞的增殖能力、细胞活力的方法与治疗。通过生长曲线,可间接计算细胞的倍增时间,而细胞倍增时间越短,则其对治疗药物的敏感度越高,反之,倍增时间长,药物治疗的敏感度低。本研究中,耐药细胞株的倍增时间较 GIST - 882 细胞株延长,符合耐药细胞株的特点。在细胞株中,加用伊马替尼药物,通过流式细胞术检测凋亡,其结果是相同条件下,耐药株 GIST - 882 - IM 细胞的凋亡率低于 GIST - 882 细胞株,提示耐药细胞株的凋亡明显受到抑制。细胞周期的分析发现,耐药细胞株的 G_0/G_1 期细胞比例增多,S 期、 G_2/M 期细胞减少,耐药细胞株阻滞于 G_0/G_1 期,DNA 合成减少,耐药细胞株的生长速度减慢,符合耐药细胞株的特性,这些更进一步证实了耐药细胞株的耐药特点。

本研究结果表明,构建的耐药株 GIST - 882 - IM 细胞,其在细胞生长速度、细胞凋亡上发生变化,符合耐药细胞株的特点。可为下一步研究伊马替尼耐药机制和筛选伊马替尼耐药的替代靶向药物奠定基础。

参考文献

- Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(12): 865 - 878
- Joensuu H, Vehtari A, Riihimäki J, *et al.* Risk of recurrence of gastrointestinal stromal tumour after surgery: an analysis of pooled population - based cohorts[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(3): 265 - 274
- Sicklick JK, Lopez NE. Optimizing surgical and imatinib therapy for the treatment of gastrointestinal stromal tumors[J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(11): 1997 - 2006
- Demetri GD, Reichardt P, Kang YK, *et al.* Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo - controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2013, 381(9863): 295 - 302
- Rutkowski P, Gronchi A, Hohenberger P, *et al.* Neoadjuvant imatinib in locally advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST): the EORTC STBSG experience[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(9): 2937 - 2943
- Joensuu H, Hohenberger P, Corless CL. Gastrointestinal stromal tumour[J]. *Lancet*, 2013, 382(9896): 973 - 983
- Zhou Y, Ling XL, Li SW, *et al.* Establishment of a human hepatoma multidrug resistant cell line in vitro[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(18): 2291 - 2297
- Eisenberg BL, Trent JC. Adjuvant and neoadjuvant imatinib therapy: current role in the management of gastrointestinal stromal tumors[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(11): 2533 - 2542
- Joensuu H. Adjuvant therapy for high - risk gastrointestinal stromal tumour: considerations for optimal management[J]. *Drugs*, 2012, 72(15): 1953 - 1963
- Maleddu A, Pantaleo MA, Nannini M, *et al.* Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(6): 1359 - 1366

(收稿日期:2016 - 07 - 26)

(修回日期:2016 - 11 - 05)

(上接第 104 页)

- 于文,黄春玉,高婉丽,等.妊娠合并颅内肿瘤的临床分析[J]. *现代妇产科进展*, 2015, 24(3): 175 - 178
- Prabhu TR. Cerebrovascular complications in pregnancy and puerperium[J]. *J Obstet Gynaecol India*, 2013, 63(2): 108 - 111
- Chiossi G, Neri I, Cavazzuti M, *et al.* Hyperemesis gravidarum complicated by Wernicke encephalopathy: background, case report, and review of the literature[J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2006, 61(4): 255 - 268
- Kotha VK, De Souza A. Wernicke's encephalopathy following Hyperemesis gravidarum. A report of three cases[J]. *Neuroradiol J*, 2013, 26(1): 35 - 40
- 龙燕玲,周娟,邹晓毅.妊娠和癫痫[J]. *华西医学*, 2014, 29(1): 160 - 163
- Battino D, Tomson T, Bonizzoniet, *et al.* Seizure control and treat-

ment in pregnancy: observations from the EURAP epilepsy pregnancy registry[J]. *Epilepsia*, 2013, 54(9): 1621 - 1627

- Yoshimatsu J, Ikeda T, Katsuragi S, *et al.* Factors contributing to mortality and morbidity in pregnancy - associated intracerebral hemorrhage in Japan[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2014, 40(5): 1267 - 1273
- Hong KS. Dual antiplatelet therapy after noncardioembolic ischemic stroke or transient ischemic attack: pros and cons[J]. *J Clin Neurol*, 2014, 10(3): 189 - 196
- Ristic DI, Vesna P, Sanja P, *et al.* Brain tumors in patients primarily treated psychiatrically[J]. *Vojnosantitetski Pregled*, 2011, 68(9): 809 - 814
- Yust - Katz S, de Groot JF, Liu D, *et al.* Pregnancy and glial brain tumors[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(9): 1289 - 1294

(收稿日期:2016 - 10 - 13)

(修回日期:2016 - 11 - 01)