



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106916788 B

(45)授权公告日 2019.06.25

(21)申请号 201710235935.1

CN 102307857 A,2012.01.04,

(22)申请日 2017.04.12

US 2015/0099775 A1,2015.04.09,

(65)同一申请的已公布的文献号

李艳艳 等.紫杉醇耐药人胃癌细胞HGC-27/  
PTX的建立及其特征鉴定.《基础医学与临床》  
.2017,第37卷(第8期),第1146-1151页.

申请公布号 CN 106916788 A

(43)申请公布日 2017.07.04

尹芬.人胃癌耐药细胞株的建立和新型β-  
内酰胺类化合物抗肿瘤耐药研究.《中国优秀硕  
士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》  
.2017,(第02期),第E072-733页.

(83)生物保藏信息

CGMCC No.13596 2017.02.07

(73)专利权人 北京市肿瘤防治研究所

地址 100142 北京市海淀区阜成路52号北  
京肿瘤医院科研楼620

Dong shao Chen et al..Dual PI3K/mTOR  
inhibitor BEZ235 as a promising  
therapeutic strategy against paclitaxel-  
resistant gastric cancer via targeting  
PI3K/Akt/mTOR pathway.《Cell Death and  
Disease》.2018,第9卷第1-11页.

(72)发明人 沈琳 高静 李艳艳

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限  
公司 11245

代理人 关畅

Gang Wu et al..AKT/ERK activation is  
associated with gastric cancer cell  
resistance to paclitaxel.《Int J Clin Exp  
Pathol》.2014,第7卷(第4期),第1449-1458页.

(51)Int.Cl.

C12N 5/09(2010.01)

C12Q 1/02(2006.01)

审查员 李世超

(56)对比文件

CN 105749295 A,2016.07.13,

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX及其制  
备方法

(57)摘要

本发明公开了人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-  
27/PTX及其制备方法。本发明所提供的人紫杉醇  
耐药胃癌细胞HGC-27/PTX,其在中国微生物菌种  
保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为  
CGMCC No.13596。本发明提供的人紫杉醇耐药胃  
癌细胞HGC-27/PTX性状稳定,可稳定多次传代,  
便于对导致细胞耐药的分子机制进行深入研究,  
是研究胃癌病人耐药机制的理想模型,具有重要  
的应用价值。

1. 人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX,其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.13596。

2. 权利要求1所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在制备产品中的应用;所述产品的功能为A1)或A2)或A3):

A1) 作为耐药模型;

A2) 研究人胃癌的紫杉醇耐药机制;

A3) 研究人胃癌细胞的耐药表型。

3. 人紫杉醇耐药胃癌细胞的制备方法,包括如下步骤:以人胃癌细胞系HGC-27为亲本细胞,采用紫杉醇诱导,获得人紫杉醇耐药胃癌细胞。

4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述“采用紫杉醇诱导”依次包括如下步骤:

(1) 培养人胃癌细胞系HGC-27,得到细胞悬浮液;

(2) 完成步骤(1)后,进行紫杉醇诱导,直至人胃癌细胞系HGC-27能在紫杉醇下正常生长;进行紫杉醇诱导时,紫杉醇浓度逐渐提高。

5. 权利要求1所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在鉴定待测药物对肿瘤抗性中的应用;所述肿瘤为胃癌。

6. 权利要求1所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在筛选抗肿瘤药物中的应用;所述抗肿瘤药物为抗胃癌药物。

7. 权利要求1所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在筛选抑制肿瘤增殖的药物中的应用;所述肿瘤为胃癌。

## 人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,具体涉及人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 胃癌是世界范围内肿瘤致死的第三大原因,其发病率与死亡率均居我国恶性肿瘤第二位。在我国,超过70%患者确诊时已是进展期或晚期,失去手术根治机会,药物治疗是进展期胃癌的主要手段。在胃癌三大类化疗药物中,紫杉醇具有疗效高、耐受性好等特性被广泛用于胃癌治疗。但随着用药时间的延长,紫杉醇耐药严重阻碍了患者继续获益。研究紫杉醇耐药机制并探索逆转耐药策略是解决问题的关键,因此急需良好的耐药机制研究模型。

### 发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是提供研究人胃癌的紫杉醇耐药机制的模型。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX。

[0005] 本发明所提供的人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX,其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.13596。

[0006] 所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在制备产品中的应用也属于本发明的保护范围;所述产品的功能可为A1)或A2)或A3):

[0007] A1) 作为耐药模型;

[0008] A2) 研究人胃癌的紫杉醇耐药机制;

[0009] A3) 研究人胃癌细胞的耐药表型。

[0010] 人紫杉醇耐药胃癌细胞的制备方法也属于本发明的保护范围。人紫杉醇耐药胃癌细胞的制备方法可包括如下步骤:以人胃癌细胞系HGC-27为亲本细胞,采用紫杉醇诱导,获得人紫杉醇耐药胃癌细胞。

[0011] 上述制备方法中,所述“采用紫杉醇诱导”依次可包括如下步骤:

[0012] (1) 培养人胃癌细胞系HGC-27,得到细胞悬浮液;

[0013] (2) 完成步骤(1)后,进行紫杉醇诱导,直至人胃癌细胞系HGC-27能在紫杉醇下正常生长;进行紫杉醇诱导时,紫杉醇浓度逐减提高。

[0014] 上述制备方法中,所述培养的培养基具体可为含10% (v/v) 胎牛血清和1% (v/v) 青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基。

[0015] 上述制备方法中,所述培养的条件为:37℃。

[0016] 上述制备方法中,所述“进行紫杉醇诱导时,紫杉醇浓度逐步提高”具体可为进行紫杉醇诱导时,紫杉醇浓度依次可为2.3nM、4.6nM、9.2nM、18.4nM、36.8nM、73.6nM和149.9nM。

[0017] 所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在鉴定待测药物对肿瘤

抗性中的应用也属于本发明的保护范围。

[0018] 上述应用中,所述肿瘤可为胃癌。

[0019] 所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在筛选抗肿瘤药物中的应用也属于本发明的保护范围。

[0020] 上述应用中,所述抗肿瘤药物可为抗胃癌药物。

[0021] 所述人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596在筛选抑制肿瘤增殖的药物中的应用也属于本发明的保护范围。

[0022] 上述应用中,所述肿瘤可为胃癌。

[0023] 相比于现有技术,本发明的有益效果如下:

[0024] (1) 人胃癌细胞系HGC-27是一个良好的体外模型。临床用于治疗胃癌的化疗药物在使用的过程中经常出现耐药性问题,病人对药物产生耐药是影响其化疗获益的重要原因。本发明提供的人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX性状稳定,可稳定多次传代,便于对导致细胞耐药的分子机制进行深入研究。

[0025] (2) 本发明提供的人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX具有临床上胃癌病人的生物学性状,是研究胃癌病人耐药机制的理想模型,大大方便了对其生物学特性及耐药表型的变化进行研究。

[0026] (3) 抗肿瘤药物的最大缺点是易产生耐药性而使化疗失效,而且,通常情况下,某种耐药细胞常常会对多种药物有交叉耐药现象,即一种药物的耐药也会导致机体对其它药物的耐受。本发明建立的这套细胞模型,对紫杉醇产生耐药,但对其它两个胃癌常用化疗药物(顺铂和氟尿嘧啶)无耐药性,是理想的单药紫杉醇耐药机制研究模型。

[0027] 因此,本发明提供的人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596具有重要的应用价值。

## 附图说明

[0028] 图1为实施例1步骤二的实验结果。

[0029] 图2为实施例3的实验结果。

[0030] 保藏说明

[0031] 科学描述:人紫杉醇耐药胃癌细胞

[0032] 参据的生物材料(株):HGC-27/PTX

[0033] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0034] 保藏机构简称:CGMCC

[0035] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号

[0036] 保藏日期:2017年2月7日

[0037] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No.13596

## 具体实施方式

[0038] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的实验材料,如无特殊说明,均购买于具有资质的常规生物材料公司。以下实施例中的定量实验,均设置三次重复实验,结果取

平均值。

[0039] RPMI-1640培养基、胎牛血清、0.25%EDTA胰蛋白酶(商品名称为“0.25%Trypsin-EDTA(1×)”)和100×青霉素/链霉素均为GIBCO公司的产品。磷酸盐缓冲液(即PBS缓冲液)为Hyclone公司的产品。人胃癌细胞系HGC-27为中国医学科学院基础医学研究所细胞中心的产品。紫杉醇注射液为北京协和药厂的产品;规格为30mg/5mL。顺铂注射液为Hospira Australia Pty Ltd的产品;规格为50mg/50mL。氟尿嘧啶注射液为天津金耀药厂的产品;规格为0.25g/10mL。

[0040] 含10%(v/v)胎牛血清和1%(v/v)青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基由10体积份胎牛血清、1体积份100×青霉素/链霉素和89体积份RPMI-1640完全培养基混合而成。

[0041] CCK-8工作液的制备方法为:由10体积份CCK-8和90体积份RPMI-1640完全培养基混合而成。CCK-8为日本同仁化学研究所的产品。

[0042] 相对活性计算公式:

$$[0043] \text{相对活性} = \frac{\text{实验组的吸光值} - \text{空白对照组的吸光值}}{\text{实验组相应的细胞对照组的吸光值} - \text{空白对照组的吸光值}} \times 100\%$$

[0044] 耐药指数计算公式:

[0045] 耐药指数 = HGC-27/PTX的半抑制浓度/HGC-27/DZ的半数抑制浓度。

[0046] 实施例1、人紫杉醇耐药胃癌细胞的建立

[0047] 一、人紫杉醇耐药胃癌细胞的建立

[0048] 采用逐步递增紫杉醇浓度、间歇作用体外诱导法构建人紫杉醇耐药胃癌细胞。具体步骤依次如下:

[0049] 1、制备HGC-27悬浮液

[0050] 用0.25%EDTA胰蛋白酶消化人胃癌细胞系HGC-27,然后加入“含10%(v/v)胎牛血清和1%(v/v)青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基”,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,得到细胞密度为72×10<sup>5</sup>个/mL的HGC-27悬浮液。

[0051] 2、制备培养体系

[0052] 取细胞培养皿,加入RPMI-1640完全培养基、HGC-27悬浮液和紫杉醇注射液,得到培养体系。该培养体系中,人胃癌细胞系HGC-27的浓度为36×10<sup>5</sup>个/mL,紫杉醇的浓度为2.3nM。

[0053] 3、培养

[0054] 将步骤2得到的培养体系置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养48h,然后弃培养基,收集细胞。

[0055] 4、清洗

[0056] 取步骤3收集的细胞,加入适量PBS缓冲液清洗3次(目的为洗去死细胞并尽量去除残留药物对细胞的影响)。

[0057] 5、稳定生长、传代和复苏

[0058] 取完成步骤4的细胞,加入RPMI-1640完全培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,直至细胞恢复正常生长(培养期间用0.25%EDTA胰蛋白酶消化细胞并稳定传代3次)。

[0059] 按照上述步骤,将“紫杉醇的浓度为2.3nM”依次替换为“紫杉醇的浓度为4.6nM”、“紫杉醇的浓度为9.2nM”、“紫杉醇的浓度为18.4nM”、“紫杉醇的浓度为36.8nM”“紫杉醇的

浓度为73.6nM”和“紫杉醇的浓度为149.9nM”，其它步骤均相同，获得人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX。

[0060] 经过检测，在紫杉醇浓度为149.9nM时，人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX可稳定生长、传代和复苏。

[0061] 人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX已于2017年2月7日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC No.13596。人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX的全称为人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX CGMCC No.13596,简称为HGC-27/PTX。

[0062] 在诱导筛选获得人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX的过程中,将亲本细胞(即人胃癌细胞系HGC-27)常规培养并传代,最终使亲本细胞和人紫杉醇耐药胃癌细胞HGC-27/PTX具有大致相同的传代次数。将该培养后的亲本细胞命名为HGC-27/DZ。

[0063] 二、细胞形态学观察

[0064] 在倒置显微镜下分别观察HGC-27/DZ和HGC-27/PTX的形态,比较两者细胞形态、大小及内容物等。

[0065] 实验结果见图1(A和B为HGC-27/DZ,C和D为HGC-27/PTX)。结果表明,HGC-27/DZ和HGC-27/PTX均呈单层贴壁生长;HGC-27/DZ细胞大小均一、边界清晰、细胞多呈梭形;与HGC-27/DZ相比,HGC-27/PTX明显变短变圆,且有成团聚集生长趋势,多数细胞具有短触角,有多核现象,胞质内颗粒样物质增多。

[0066] 实施例2、HGC-27/PTX对紫杉醇、顺铂和氟尿嘧啶的敏感性

[0067] 1、HGC-27/PTX对紫杉醇的敏感性

[0068] 设置实验组,然后进行如下步骤:

[0069] (1) 在含10% (v/v) 胎牛血清和1% (v/v) 青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基中培养待测细胞(HGC-27/PTX或HGC-27/DZ),获得细胞悬浮液。

[0070] (2) 取96孔板,每孔接种100 $\mu$ L步骤(1)制备的细胞悬浮液(每孔含待测细胞约 $1 \times 10^4$ 个),置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。

[0071] (3) 完成步骤(2)后,取所述96孔板,加入紫杉醇注射液,得到处理体系;当待测细胞为HGC-27/PTX时,处理体系中的紫杉醇的浓度为2.5nM、5nM、10nM、50nM、250nM或1250nM(每个紫杉醇浓度设置3个复孔);当待测细胞为HGC-27/DZ时,处理体系中的紫杉醇的浓度为1nM、2nM、4nM、8nM、16nM、32nM、64nM或128nM(每个紫杉醇浓度设置3个复孔)。

[0072] (4) 完成步骤(3)后,将所述96孔板置于5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C培养箱中培养48h,然后弃掉各孔中培养基,每孔迅速加入100 $\mu$ L CCK-8工作液,继续5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C培养30min、1h或2h。最后采用酶标仪检测450nm处的吸光值,按吸光值在1.0~2.0之间的组(按培养时间不同分组的)的数据计算HGC-27/PTX细胞增殖程度。

[0073] 设置空白对照组:用等体积“含10% (v/v) 胎牛血清和1% (v/v) 青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基”代替细胞悬浮液,其它操作同实验组。每个紫杉醇浓度设置3个复孔。

[0074] 设置细胞对照组:用等体积“含10% (v/v) 胎牛血清和1% (v/v) 青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基代替紫杉醇注射液,其它操作同实验组。细胞悬浮液设置3个复孔。

[0075] 以紫杉醇在孔中的浓度为横坐标,相对活性为纵坐标,比较紫杉醇处理后待测细

胞增殖的程度。

[0076] 实验结果见表1中第二行。结果表明,HGC-27/PTX的半数抑制浓度(IC50)为658.3nM,HGC-27/DZ的半数抑制浓度(IC50)为4.73nM;耐药指数(RI)为139.18。因此,HGC-27/PTX属于高度耐紫杉醇(已有文献记载:耐药指数<5,为低度耐药;5<耐药指数<15,为中等耐药;耐药指数>15,为高度耐药)。

[0077] 表1

药物	半数抑制浓度 (IC50)		耐药指数 (RI)
	HGC-27/DZ	HGC-27/PTX	
紫杉醇	4.73	658.3*	139.18
顺铂	2.47	4.14	1.68
氟尿嘧啶	22.26	20.97	0.94

[0079] 注:\*表示差异显著。

[0080] 2、HGC-27/PTX对顺铂的敏感性

[0081] 设置实验组,然后进行如下步骤:

[0082] (1) 同步骤1中(1)。

[0083] (2) 同步骤1中(2)。

[0084] (3) 完成步骤(2)后,取所述96孔板,加入顺铂注射液,得到处理体系;处理体系中的顺铂的浓度为0.5nM、1nM、2nM、4nM、8nM或16nM(每个顺铂浓度设置3个复孔)。

[0085] (4) 同步骤1中(4)。

[0086] 设置空白对照组:用等体积“含10%(v/v)胎牛血清和1%(v/v)青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基”代替细胞悬浮液,其它操作同实验组。每个顺铂浓度设置3个复孔。

[0087] 设置细胞对照组:用等体积“含10%(v/v)胎牛血清和1%(v/v)青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基”代替顺铂注射液,其它操作同实验组。细胞悬浮液设置3个复孔。

[0088] 以顺铂在孔中的浓度为横坐标,相对活性为纵坐标,比较顺铂处理后待测细胞增殖的程度。

[0089] 实验结果见表1中第三行。结果表明,HGC-27/DZ和HGC-27/PTX对顺铂的敏感性无显著差异。

[0090] 3、HGC-27/PTX对氟尿嘧啶的敏感性

[0091] 设置实验组,然后进行如下步骤:

[0092] (1) 同步骤1中(1)。

[0093] (2) 同步骤1中(2)。

[0094] (3) 完成步骤(2)后,取所述96孔板,加入氟尿嘧啶注射液,得到处理体系;处理体系中的氟尿嘧啶的浓度为1nM、2nM、4nM、8nM、16nM、32nM、64nM或128nM(每个氟尿嘧啶浓度设置3个复孔)。

[0095] (4) 同步骤1中(4)。

[0096] 设置空白对照组:用等体积“含10%(v/v)胎牛血清和1%(v/v)青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基”代替细胞悬浮液,其它操作同实验组。每个氟尿嘧啶浓度设置3个复

孔。

[0097] 设置细胞对照组:用等体积“含10% (v/v) 胎牛血清和1% (v/v) 青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基”代替氟尿嘧啶注射液,其它操作同实验组。细胞悬浮液设置3个复孔。

[0098] 以氟尿嘧啶在孔中的浓度为横坐标,相对活性为纵坐标,比较氟尿嘧啶处理后待测细胞增殖的程度。

[0099] 实验结果见表1中第四行。结果表明,HGC-27/DZ和HGC-27/PTX对氟尿嘧啶的敏感性无显著差异。

[0100] 上述结果表明,HGC-27/PTX对紫杉醇产生耐药,但对其它两个胃癌常用化疗药物(顺铂和氟尿嘧啶)无耐药性,是理想的单药紫杉醇耐药机制研究模型。

[0101] 实施例3、HGC-27/PTX的细胞周期检测

[0102] 1、在含10% (v/v) 胎牛血清和1% (v/v) 青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基中培养待测细胞(HGC-27/PTX或HGC-27/DZ),获得细胞悬浮液甲。

[0103] 2、取6孔板,每孔接种2mL步骤(1)制备的细胞悬浮液甲(每孔约含待测细胞 $30 \times 10^4$ 个),置于37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。

[0104] 3、取所述6孔板,加入紫杉醇注射液,得到处理体系;当待测细胞为HGC-27/PTX时,处理体系中的紫杉醇的浓度为128nM、200nM或400nM(每个紫杉醇浓度设置3个复孔);当待测细胞为HGC-27/DZ时,处理体系中的紫杉醇的浓度为1nM、2nM或4nM(每个紫杉醇浓度设置3个复孔)。

[0105] 4、完成步骤3后,将所述6孔板置于5%CO<sub>2</sub>、37°C培养箱中培养48h,获得细胞悬浮液乙。

[0106] 5、取细胞悬浮液甲或细胞悬浮液乙,室温1000rpm/min离心5min,收集沉淀。

[0107] 6、取步骤5收集的沉淀,加入1mL预冷的PBS缓冲液重悬,然后室温1000rpm/min离心5min,收集沉淀。

[0108] 7、取步骤6收集的沉淀,加入250μL预冷的PBS缓冲液重悬,然后逐滴加入750μL预冷的无水乙醇(边滴加边摇动),混匀,置于4°C冰箱中过夜固定。

[0109] 8、完成步骤7后,室温1000rpm/min离心5min,收集沉淀。

[0110] 9、取步骤8收集的沉淀,加入1mL PBS缓冲液重悬,室温1000rpm/min离心5min,收集沉淀。

[0111] 10、取步骤9收集的沉淀,加入300μL PI/RNase缓冲液,室温避光孵育15min;细胞筛网过滤后用流式细胞仪检测细胞周期,然后用Graphpad Prism 5软件分析细胞周期的分布。

[0112] 实验结果见图2。结果表明,与HGC-27/DZ相比,HGC-27/PTX的S期(41.44% vs.32.9%, $P < 0.01$ )与G2/M期细胞(37.87% vs.18.36%, $P < 0.01$ )的比例明显增多;用紫杉醇处理HGC-27/DZ时,G2/M期细胞比例随紫杉醇浓度增加而增加;用紫杉醇处理HGC-27/PTX时,紫杉醇对细胞周期的影响较小,说明HGC-27/PTX已对紫杉醇产生耐药。

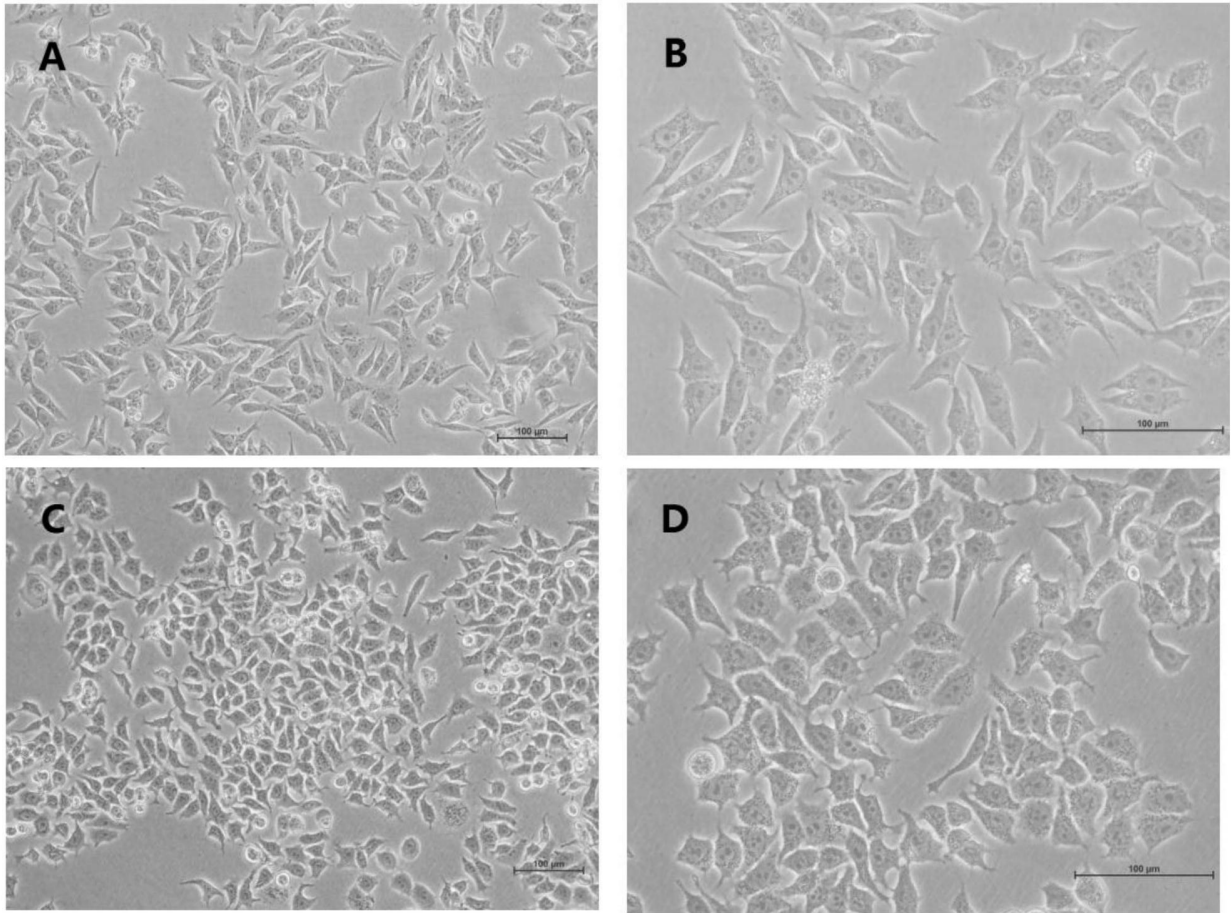
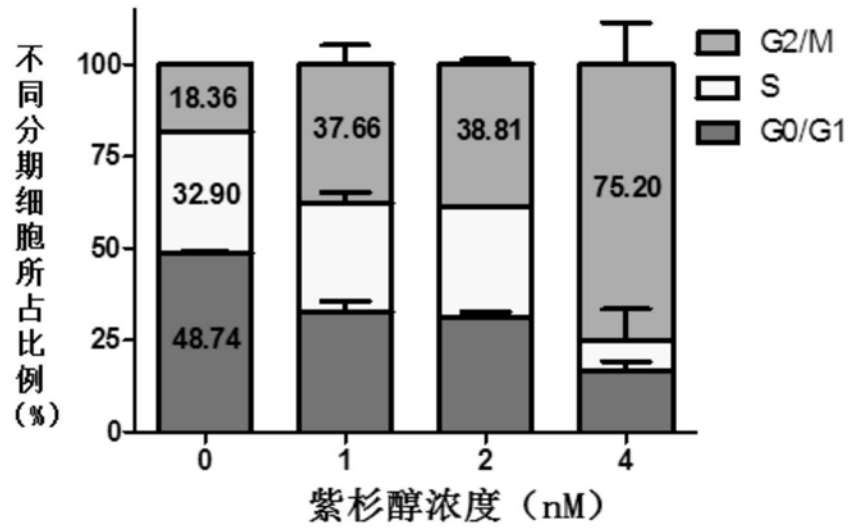
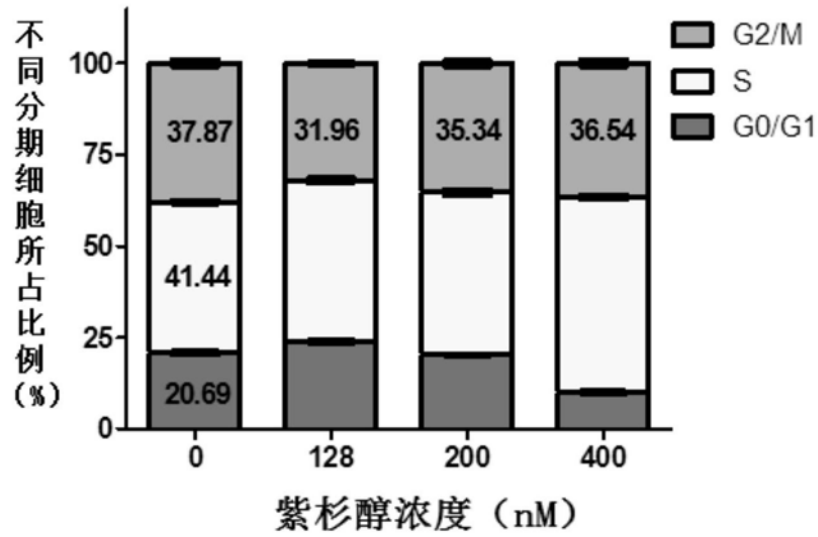


图1



A



B

图2