DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.002
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)16-1405-03

论著

人小细胞肺癌SH77多药耐药细胞系的建立及其生物学特征分析

周向东,钱桂生,刘凌志 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 建立人小细胞肺癌SH77/CDDP MDR细胞株并检测其生物学特性。方法 应用肺癌化疗的一线药物顺铂采用逐步增加剂量的方法诱导人SCLC细胞系SH77,建立MDR细胞系SH77/CDDP;检测耐药细胞及其亲代细胞对7种化疗药物的敏感性;观察细胞形态和超微结构;测定细胞生长曲线和细胞周期。结果 在国内首次成功建立了SCLC MDR细胞系SH77/CDDP,药敏结果显示该细胞对7种化疗药物有不同程度的抗药性;耐药细胞较其亲代略增大,核浆比例减小,线粒体、高尔基体、粗面内质网和游离核糖体增多,细胞表面指状突起明显;耐药细胞与其亲代细胞增殖速度接近;其S期细胞增多($P<0.05$),提示耐药细胞DNA合成增加。结论 SH77/CDDP是可靠的人SCLC MDR细胞模型,SH77/CDDP的建立为进一步探讨顺铂致人SCLC MDR的发生机制奠定了基础。

关键词:肺肿瘤;耐药;顺铂
中图法分类号:R329.2^{+}4;R73-35^{+}4;R734.2 文献标识码:A

Establishment of human small cell lung cancer SH77 multidrug resistance cell line and analysis of its biological properties

ZHOU Xiang-dong, QIAN Gui-sheng, LIU Ling-zhi (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a small cell lung cancer (SCLC) multidrug resistance (MDR) cell line SH77/CDDP and analyze its biological properties. Methods The SCLC MDR cell line SH77/CDDP was established by increasing gradually the dose of cisplatin, the first-line chemotherapeutic drug for lung cancer. The chemosensitivities of SH77/CDDP and its parental cell line to 7 chemotherapeutic drugs were tested. Changes in cellular morphology and ultrastructure were observed. The cell growth curve and cell cycle were also determined. Results SCLC MDR cell line SH77/CDDP having different drug-resistance to the 7 chemotherapeutic drugs was established successfully. Compared with that of its parental cell, the size of MDR cell was a bit bigger. The ratio of nucleus to cell plasma decreased and mitochondria, Golgi bodies, rough endoplasmic reticulums and free ribosomes increased. The finger-like apophysis was obvious. The rate of cell proliferation of SH77/CDDP was similar to that of SH77, but the number of cells in S phase increased ($P<0.05$), suggesting that the DNA synthesis was increased in MDR cell line. Conclusion SH77/CDDP is a reliable MDR cell model of human SCLC. The establishment of this cell line has laid basis for further study of the mechanism of human SCLC MDR induced by cisplatin.

Key words: lung tumor; drug resistance; cisplatin

建立多药耐药细胞系是体外研究多药耐药(Multidrug resistance, MDR)的基础。顺铂是肺癌化疗的一线药物之一,在临床应用中,虽然小细胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC)患者经初始化疗疗效明显,但很快即对顺铂产生耐药性,影响治疗效果。到目前为止,由顺铂导致肺癌MDR的机制尚未完全清楚。

由于SCLC对化疗药物非常敏感,体外诱导建立SCLC MDR细胞系比较困难,到目前为止,经检索国内尚未见成功建立SCLC MDR细胞系的报道。为探讨SCLC细胞对顺铂产生耐药性的机制,本实验以顺铂为诱导药物,人SCLC细胞系SH77为诱导对象,采用逐步增加剂量的方法,诱导建立人SCLC MDR细胞系SH77/CDDP,并对其主要生物学特征进行观察。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

人SCLC细胞系SH77购于上海细胞所;RPMI1640培养基和小牛血清为Hyclone产品;二甲基四氮唑蓝(MTT)和二甲亚砜为Sigma产品;顺铂、盐酸拓扑替康、阿霉素、5-氟尿嘧啶、长春新碱、羟基喜树碱和足叶乙甙分别购自昆明三戊贵金属药业有限公司、重庆润康药业有限公司、深圳万乐药业有限公司、海普药

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200118);重庆市应用基础研究资助项目(2002-2004)
作者简介:周向东(1963-),男,河南省平舆县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肺癌方面的研究,发表论文16篇,现在附属西南医院呼吸内科。电话:(023)65387412
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2003-01-30;修回日期:2003-06-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

业有限公司、上海华联制药有限公司、黄石飞云制药有限公司和江苏恒瑞药业有限股份公司。

1.2 SH77/CDDP 细胞株的建立

以人 SCLC 细胞系 SH77 为诱导对象，顺铂为诱导药物，采用逐步增加剂量的方法诱导。在测定 SH77 细胞对顺铂的最低耐受浓度后，用终浓度为 0.005 μg/ml 的顺铂与 SH77 细胞共同培养，待细胞稳定生长后传代，以后逐渐增加顺铂浓度，历时 16 个月，共传 105 代，直至 SH77 细胞在 0.4 μg/ml 顺铂浓度下稳定生长和传代。

1.3 二甲基四氮唑蓝(MTT)法检测 SH77 和 SH77/CDDP 的药物敏感性[1]

将对数生长期细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板中，分别加入上述 7 种化疗药物以及 RPMI1640 培养基，每孔总体积 200 μl。每种药物设 5 种浓度，各浓度之间相差 2～5 倍，设复孔，空白对照孔不加化疗药。以下步骤按常规方法进行，计算药物作用的 50% 抑制浓度(IC_{50})。

1.4 细胞生长曲线的测定

将对数生长期细胞以 5×10^3 个/孔接种于 24 孔板中，接种后 24、48、72、96、120、148 h 分别计数每孔的细胞数，每次计数 3 孔，取平均值绘制细胞生长曲线，并计算倍增时间(Td)。

$$Td\ (h)=T\times\frac{\log2}{\log N-\log N_0}$$

Td 为倍增时间，T 为对数增殖期时间 (h)，N 为对数增殖期结束时的细胞数，N_0 为对数增殖期开始时的细胞数。

1.5 形态学观察

1.5.1 光镜 倒置显微镜观察。

1.5.2 透射电镜(JEOL-2000EX) 细胞离心后用 Hanks 液洗涤 2 次，制成细胞悬液，1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清，加入 4 ℃预冷的 0.25% 戊二醛固定沉淀细胞。包埋切片后，观察照相。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

收获 SH77 和 SH77/CDDP 对数生长期细胞，漂洗离心后加入 70% 冷乙醇 4 ℃固定至少 48 h。检测前用 0.01 mol/L PBS 充分漂洗细胞，调细胞数至 10^5/ml，加入碘化丙啶(Propidium iodide，PI)染色液 1 ml，37 ℃孵育 30 min 后，4 ℃染色 30 min。在流式细胞仪上测定细胞周期。

1.7 统计学方法

数据采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 SH77/CDDP 的药物敏感性与多药耐药特性

采用逐步增加剂量的方法经 16 个月诱导，建立了人 SCLC 多药耐药细胞系 SH77/CDDP。药敏结果表明，SH77/CDDP 对顺铂、足叶乙甙、长春新碱、5-氟尿嘧啶、拓扑替康、羟基喜树碱和阿霉素的耐药指数分别为 10.96、17.64、43.69、28.28、3.76、8.31 和 11.67，提示该细胞对上述化疗药物具有不同程度的耐药性，即 MDR。

2.2 细胞生长曲线和倍增时间

SH77 和 SH77/CDDP 倍增时间分别为 40.86 h 和 42.84 h，耐药细胞与其亲代细胞增殖速度接近，表明在产生耐药性后细胞增殖未受到抑制，见图 1。

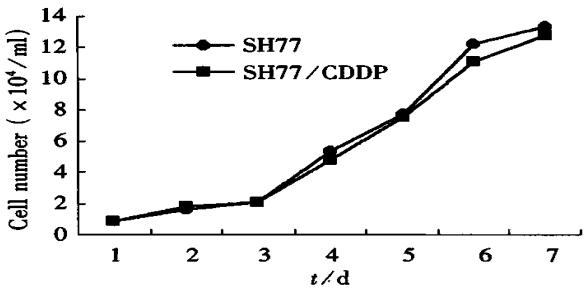


图 1 SH77 和 SH77/CDDP 细胞生长曲线

Fig 1 Cell growth curves of cell line SH77 and SH77/CDDP

2.3 细胞形态学观察

倒置显微镜下 SH77 和 SH77/CDDP 细胞均为团状悬浮生长，呈圆形或卵圆形，SH77 细胞较小，SH77/CDDP 细胞稍大。透射电镜下 SH77 细胞核大，细胞浆少，核浆比例大，胞浆内细胞器少，可见少量短小线粒体和高尔基体，细胞膜有较多细长微绒毛，见图 2；而 SH77/CDDP 细胞核变小偏向一侧，呈卵圆形或不规则状，细胞浆增多，核浆比例减小，胞浆内可见空泡，线粒体、高尔基体、粗面内质网和游离核糖体增多，细胞表面指状突起明显，见图 3。



图 2 SH77 细胞的超微结构 (TEM×4 200)

Fig 2 The ultrastructure of SH77 cell line (TEM×4 200)

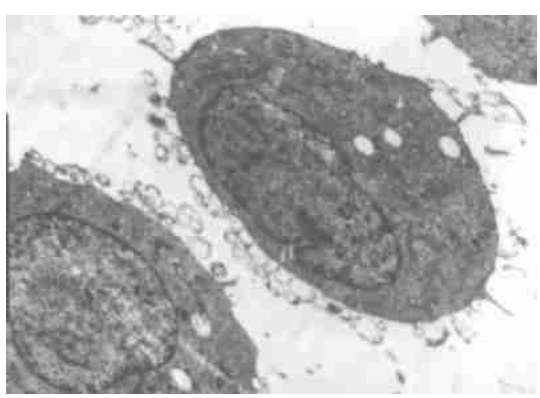


图 3 SH77/CDDP 细胞的超微结构 (TEM×4 200)

Fig 3 The ultrastructure of SH77/CDDP cell line (TEM×4 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　顺铂诱导前后细胞周期的变化

与亲代细胞相比, SH77/CDDP S 期细胞增多($P<0.05$), G_0/G_1 期、G_2/M 期细胞无明显变化($P>0.05$)。

3　讨论

化疗是肺癌治疗的主要手段, SCLC 患者尤为如此。近年来虽然不断有新的化疗药物问世, 但临床上仍有相当一部分肺癌患者化疗效果不佳。研究表明, MDR 是导致肺癌化疗失败的主要原因, 因此, 研究肺癌 MDR 的机制以及寻求逆转 MDR 的方法已成为肺癌研究的方向之一。体外建立 MDR 细胞系是研究肿瘤细胞产生 MDR 机制的重要手段, 应用抗癌药已成功地建立了包括肝癌、白血病和膀胱癌[2] 等多种 MDR 细胞株。顺铂是细胞周期非特异的细胞毒类药物, 可抑制癌细胞 DNA 复制过程并损伤其细胞膜结构, 有较强的广谱抗癌作用。含顺铂的化疗方案目前仍然是肺癌的主要治疗手段之一, 因此, 应用顺铂诱导建立的肺癌 MDR 细胞系具有较好的代表性[3,4]。

目前诱导建立 MDR 细胞株的方法包括逐步增加剂量法[5]、间歇大剂量冲击法[4] 和大剂量冲击与逐步增加剂量相结合的方法[6]。在诱导过程中我们发现, 间歇大剂量冲击法对细胞损伤较大, 细胞生长缓慢, 需要较长的时间才能恢复, 且剂量不宜掌握; 大剂量冲击与逐步增加剂量相结合的方法仍然具有以上缺点, 因此, 本研究采用逐步增加剂量的方法进行诱导。成功诱导耐药细胞的体会是: 亲代细胞必须等到细胞活性好、生长旺盛时才能开始用药物诱导, 诱导前必须先测定该细胞对顺铂的最低耐受剂量, 然后再逐步增加剂量。这样诱导剂量容易掌握又比较安全, 成功率高, 且所需时间并不比其它两种方法长。本研究以顺铂为诱导药物, 采用逐步增加剂量的方法经过 16 个月的诱导首次在国内成功建立了人 SCLC MDR 细胞系 SH77/CDDP。药敏结果表明, SH77/CDDP 对顺铂、足叶乙甙、5-氟尿嘧啶、长春新碱、拓扑替康和羟基喜树碱等药物均有不同程度的耐药性。形态学观察、生长曲线和倍增时间等指标检测显示耐药细胞性状稳定, 是可靠的人 SCLC MDR 细胞模型, 这为进一步探讨顺铂致人 SCLC MDR 的发生机制和克隆新的 SCLC 耐药相关基因奠定了基础。

对 MDR 细胞增殖特性和形态结构变化方面的研究迄今为止仍不够深入。Chu[7] 和 Mattern[8] 采用相同的药物和方法培养不同的肺癌 MDR 细胞系, 其增殖特性和结构变化均有差异, 具体机制尚不清楚, 可能与肺癌细胞的异质性有关。超微结构显示, SH77 细胞核大, 细胞浆少, 胞浆内细胞器少, 细胞膜有较多细长微绒毛, 提示细胞较原始, 分化程度低; 而 SH77/CDDP 细胞的核变小偏向一侧, 细胞浆增多, 胞浆内可见空泡, 线粒体、高尔基体和粗面内质网增多, 细胞表面指状突起明显, 提示耐药细胞有向成熟细胞分化的迹象。由于耐药细胞粗面内质网增多, 表明随着耐药性的产生, 酶类蛋白的合成也在增加。陈杰[6] 和胡义德[5] 在分别观察 SPC-A-1/CDDP 和 A549/ADM 的超微结构时也发现了相似的现象, 但其原因不清。推测其原因可能与以下因素有关: ①诱导耐药的过程实际上也是一个筛选细胞的过程, 由于肺癌细胞具有异质性, 大部分敏感细胞被杀死, 少数不敏感的细胞存活下来并占据主导地位; ②肿瘤细胞向成熟细胞分化以躲避化疗药的攻击; ③化疗药可能具有诱导分化的作用。本研究发现 SH77/CDDP 与其亲代细胞系相比较增殖速度无显著差异, 这与陈杰等[6] 所诱导的 SPC-A-1/CDDP 细胞系的结果一致, 表明耐药细胞的增殖速度并不随耐药性的产生而出现明显变化。

总之, 本研究应用逐步增加剂量的方法首次在国内成功建立了 SCLC MDR 细胞系 SH77/CDDP, 并对其生物学性状进行了初步鉴定, 这为进一步探讨顺铂致人 SCLC MDR 发生的机制奠定了基础。

参考文献:

[1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社西安分公司出版, 1996. 186－189.

[2] 戴越盟, 林琦远, 严律南, 等. 阿霉素诱导人肝细胞癌细胞 SMMC-7721 耐药性的产生及其机理的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 23(2): 135－137.

[3] 陈　鹏, 刘叙仪, 赫复生. 耐顺铂人肺腺癌细胞系 A549/CDDP 的建立及耐药机制[J]. 中国肿瘤临床, 1995, 3(4): 582－587.

[4] 李　曦, 郭先健, 黄桂君, 等. 人肺腺癌多药抗药细胞系 LC-3/CDDP 细胞周期及 DNA 含量变化[J]. 河南肿瘤学杂志, 1997, 10(2): 93－95.

[5] 胡义德, 钱桂生. 人肺腺癌 A549 多重抗药细胞株生物学特性的变化[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(5): 421－423.

[6] 陈　杰, 钱桂生, 黄桂君, 等. 人肺腺癌多药耐药细胞系的建立及其生物学特征[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(2): 135－137.

[7] Chu J J, Chiang C D, Rao C S, *et al*. Establishment and characterization of a paclitaxel-resistant human non-small cell lung cancer cell line[J]. Anticancer Res, 2000, 20(4): 2449－2456.

[8] Mattern J, Bak M, Volm M. Intrinsic and acquired multidrug resistance in human lung carcinomas grown in nude mice[J]. Anticancer Res, 1990, 10(1): 177－180.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net