DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.031
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0187-02

论著

多药耐药细胞系 HL-60/Mx 的建立

常 城[1],陆俊羽[2],孔佩艳[1] (第三军医大学附属新桥医院:[1]血液内科;[2]全军呼吸内科研究所;重庆 400037)

提 要:目的 探讨建立多药耐药(MDR)白血病细胞系的简便方法。方法 HL-60细胞反复暴露于浓度递增的米托蒽醌(Mx)培养液中,暴露间期维持低浓度培养;MTT法检测耐药性改变,并对其P糖蛋白(P-170)、多药耐药相关蛋白(MRP)表达进行免疫组化检测。结果 ①HL-60/Mx细胞系对多种化疗药物产生耐药。②MRP阳性表达率增高。结论 本方法为建立耐药HL-60细胞系的有效方法。

关键词:多药耐药;米托蒽醌
中图法分类号:R733.7;R915;R919.1 文献标识码:A

Establishment of multidrug resistance cell line HL-60/Mx

CHANG Cheng, LU Jun-yu, KONG Pei-yan (Department of Haematology, Xinqiao Hospital, Third military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To find a simple and convenient method to establish a multidrug resistance cell line. Methods HL-60 cells were cultured in the mediums with discontinuously increasing mitoxantrone (Mx) repeatedly and with a lower concentration of Mx at every interval. The changes of the drug resistance of the cells were determined by MTT. The expressions of P-170 and MRP protein were detected immunohistochemically. Results ①HL-60/Mx cells were proved miltidrug-resistant. ②The positive rate of MRP protein in HL-60/Mx was increased. Conclusion This method is practicable to establish a multidrug resistance cell line of HL-60 cells.

Key words: multidrug resistance (MDR); mitoxantrone(Mx)

多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是导致白血病化疗失败最主要的原因。体外研究MDR,首先必须建立可靠的MDR细胞系。我们将HL-60细胞反复暴露在含有米托蒽醌(Mitoxantrone,Mx)的培养液中,建立了HL-60/Mx细胞系。

1 材料与方法

1.1 药品

米托蒽醌(四川升和医药公司)、长春新碱(VCR,上海华联制药公司)、甲氨喋呤(MTX,上海华联制药公司)、环磷酰胺(CTX,上海华联制药公司)、吡喃阿霉素(THP,深圳万乐药业公司)、鬼臼乙叉甙(Etoposidi Vp16,江苏恒瑞医药公司)。

1.2 试剂

噻唑蓝(MTT,Sigma公司)、二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司)。

培养液配制:90% RPMI1640/10% 胎牛血清,调节pH值到7.0,4 ℃冰箱备用。

免疫组化P-170试剂盒、MRP试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.3 细胞株及培养条件

HL-60细胞株购自上海细胞研究所。细胞于上述培养液中,37 ℃,全湿度,5% CO_2培养箱培养,每3 d更换培养液。

1.4 暴露方法

取对数生长期HL-60细胞,培养条件同上。在培养液中反复加入米托蒽醌,具体步骤如下:①含Mx 5 ng/ml培养液培养3 d→无药培养液中培养3 d反复3次;②含Mx 10 ng/ml培养液培养3 d→含Mx 2.5 ng/ml培养液培养3 d反复3次;③含Mx 20 ng/ml培养液培养3 d→含5 ng/ml培养液培养3 d反复3次;④含Mx 40 ng/ml培养液培养3 d→含Mx 10 ng/ml培养液培养3 d反复3次;⑤含Mx 10 ng/ml培养液中长期培养,进行各项实验前无药培养液培养3 d。

1.5 细胞耐药性检测

采用MTT法[1],选用Mx、VCR、THP、MTX、Vp16等5种药物进行检测。

1.5.1 对数生长期HL-60/Mx和HL-60细胞悬液1×10^5/ml,接种于96孔板,每孔0.2 ml。

1.5.2 上述每种化疗药物分3个浓度,1x、0.1x、0.01x(x为药物推荐使用剂量,按60 kg体重成人折算,μg/ml),每种浓度各加3复孔。37 ℃,全湿度,5% CO_2培养箱培养72 h。

1.5.3 离心后弃上清液,加1640液200 μl/孔,同时加噻唑蓝液20 μl(5 mg/ml),继续孵育5 h。

1.5.4 离心后弃上清液,加DMSO液200 μl/孔,室温20 min。

1.5.5 自动酶标仪测D_λ值。

1.5.6 计算出半数抑制浓度(IC50)及耐药倍数(RF)。

$$RF=\frac{IC50(HL\text{-}60/Mx)}{IC50(HL\text{-}60)}$$

1.6 HL-60/Mx和HL-60细胞中P糖蛋白(P-170)及多药耐药相关蛋白(Multidrug resistance-associated protein, MRP)表达阳性率测定

浓缩细胞悬液涂片,按照试剂盒说明书操作步骤进行免疫组化染色。每组制片5张,每张随机计数200个细胞,计算阳性表达率。

1.7 统计学分析

使用EXCEL软件,作t检验。

2 结果

2.1 HL-60/Mx细胞耐药谱

HL-60/Mx细胞除了对Mx产生耐药,同时对其他多种药物

作者简介:常 城(1972-),男,云南省昆明市人,硕士研究生,医师,主要从事白血病诊断治疗方面的研究。电话:(023)68755000-74609

收稿日期:2001-04-14;修回日期:2001-10-16

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

产生交叉耐药，见表 1。

2.2 P-170、MRP 阳性表达率

P-170 在 HL-60 及 HL-60/Mx 细胞中的表达无显著性差异。MRP 在 HL-60 及 HL-60/Mx 细胞中表达有非常显著性差异（$P<0.01$），见表 2。

表 1 HL-60/Mx 细胞耐药谱（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of drug resistance of HL-60/Mx cells（$\bar{x}\pm s$）

	IC50（ng/ml）		RF
	HL-60	HL-60/Mx	
Mx	12.4±4.2	188.2±20.1	15.2
VCR	3.1±0.5	35.1±5.2	11.3
MTX	3.6±0.9	13.2±4.5	3.8
THP	36.6±3.1	422.7±130.7	11.6
Vp16	324.2±42.5	3044.5±411.8	9.4

表 2 P-170、MRP 在两细胞系中的阳性表达率（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Rates of expression of P-170, MRP in HL-60 cells and HL-60/Mx cells（$\bar{x}\pm s$）

	HL-60（%）	HL-60/Mx（%）	*P* value
P-170	5.6±1.6	6.0±1.3	0.2109
MRP	6.2±1.7	10.0±2.2	0.0044

3 讨论

目前，化学治疗仍然是白血病及其他恶性肿瘤的主要治疗方法，然而在化疗过程中，MDR 的产生不可避免，直接影响化疗效果。MDR 的产生导致肿瘤细胞对多种化疗药物的全面耐受，是白血病治疗过程中急需攻克的难题之一[2,3]。体外建立 MDR 细胞系，为研究 MDR 机制、寻找逆转耐药方法提供了基本的条件，对提高化疗效果、最终根治白血病有重要意义。米托蒽醌属于蒽环类抗肿瘤药物，分子量为 444.49（$C_{22}H_{28}N_4O_6$），通过与细胞 DNA 分子结合，抑制核酸合成而导致细胞死亡，与其他蒽环类药物无交叉耐药性。我们将 HL-60 细胞反复暴露在浓度递增的 Mx 环境中，结合低浓度持续刺激，建立了 HL-60/Mx 细胞系。此细胞系不但对 Mx 耐药（RF：15.2），同时对化学结构和药理作用均不相同的 VCR、MTX、THP、Vp16 产生耐药，RF 分别达 11.3、3.8、11.6、9.4，与临床病人对药物的抗性倍数 2～10 倍基本符合[4]，适合 MDR 研究。

白血病细胞表达 ATP 结合膜转运蛋白（ATP-binding cassette transporter），P-170、MRP、LRP（Lung resistance related protein）以及新近发现的 BCRP（Breast cancer resistance protein）是 MDR 的重要机制之一[5～7]，是否表达 ABC 也成为鉴定 MDR 的一个重要手段。本实验显示 HL-60/Mx 细胞系 MRP 表达阳性率较产生耐药前明显增高（$P=0.0044$），而 P-170 表达阳性率无明显变化，与美国组织、细胞培养中心（ATCC）提供的资料一致。目前，国内外许多细胞研究所均可提供 MDR 细胞系，但大多价格昂贵且无具体耐药谱资料，自行诱导不但费时、费力，最主要问题是没有经典诱导方法。本实验通过参考许多实验室诱导产生 MDR 方法的优点，建立了反复暴露合并小剂量负荷的诱导方法，成功地用米托蒽醌诱导出了 HL-60/Mx 细胞系。此方法具有简便、需时短、成功率高等优点，不失为自行建立 MDR 细胞系的好方法。完整、详细的耐药细胞资料还应该包括耐药的持久性、细胞遗传学变化、分子生物学变化方面的内容，如耐药性是否伴有染色体变化，是否伴有 bcl-2、bax、Fas/Fasl、P53 等表达的变化，以及是否伴有拓扑异构酶Ⅱ表达的改变等。这些方面的工作有待进一步研究。

参考文献：

[1] Sergeant J M, Jailor C G. Appraisail of the MTT assay as a rapid test of chemo-sensitivity in acute myeloid leukemia[J]. Br J Cancer, 1989, 60(2): 206－210.

[2] Mansson E, Paul A, Lofgren C, *et al*. Cross-resistance to cytosine arabinoside in a multidrug-resistant human promyelocytic cell line selected for resistance to doxorubicin: implications for combination chemotherapy[J]. Br J Haematol, 2001, 114(3): 557－565.

[3] Lehne G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer[J]. Curr Drug Targets, 2000, 1(1): 85－99.

[4] Antamank, Eder J P, Elias A, *et al*. High dose combination alkylating agent preparation regimen with antologous bone marrow support: the Dara Farker Cancer Znstitutc/Beth Israel Hospital experience[J]. Cancer Treatment Reports, 1987, 71(2): 119－125.

[5] Ross D D. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia[J]. Leukemia, 2000, 14(3): 467－473.

[6] Lage H, Perlitz C, Abele R, *et al*. Enhanced expression of human ABC-transporter tap is associated with cellular resistance to mitoxantrone[J]. FEBS Lett, 2001, 503(2-3): 179－184.

[7] Kim C H, Gupta S. Expressio of TRAIL (Apo2L), DR4 (TRAIL receptor 1), DR5 (TRAIL receptor 2) and TRID (TRAIL receptor 3) genes in multidrug resistant human acute myeloid leukemia cell lines that overexpress MDR1 (IIL60/Tax) or MRP (IIL60/AR)[J]. Int J Oncol, 2000, 16(6): 1 137－1 139.

（编辑 王 红）

（上接 186 页）

像诊断常误诊为输尿管结石或膀胱结石。结石的成因不清楚，子宫阔韧带结石可能是某种非特异炎症致钙盐在子宫阔韧带软组织内沉积所至，卵巢结石可能是在卵巢囊肿的基础上发生。此前仅见的 1 例卵巢巨结石为 1999 年汪新亚[1] 所报道，大小为 6.5 cm×7.5 cm。

与泌尿系结石和胆结石不同，卵巢结石和子宫阔韧带结石症状不典型，本身又极罕见，因此多在行下腹部影像学检查时偶然发现，但多数结石常被误诊为来源于泌尿系统，术前很少确诊。影像检查发现的盆腔高密度影，应常规行泌尿系造影加以鉴别诊断，只要思想重视术前应可明确诊断。卵巢结石和子宫阔韧带结石的治疗，若结石较小手术剥出即可，若结石巨大难以剥离，则行一侧附件切除，本报告两例病人均痊愈出院。

关键词：子宫阔韧带结石；卵巢巨大结石

中图法分类号：R711.7 文献标识码：B

参考文献：

[1] 汪新亚. 卵巢囊肿巨结石一例[J]. 临床放射学杂志, 1999, 18(5): 22.

（编辑 冯崇英）

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