DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.007
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0135-03

论著

人肺腺癌多药耐药细胞系的建立及其生物学特征

陈 杰,钱桂生,黄桂君,熊 玮 (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 建立人肺腺癌多药耐药细胞系。方法 以顺铂为诱导药物,人肺腺癌细胞系SPC-A-1为诱导对象,采用大剂量冲击与逐步增加剂量相结合的方法,诱导建立人肺腺癌多药耐药细胞系SPC-A-1/CDDP;MTT法测定药物敏感性,透射和扫描电镜观察形态变化,常规染色体检测分析染色体变化。结果 用192 d建成人肺腺癌多药耐药细胞系SPC-A-1/CDDP,它对顺铂的耐药指数为11.2,对顺铂、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、长春新碱和足叶乙甙等药物有不同程度的耐药性,但对羟基喜树碱无耐药性,电镜观察可见SPC-A-1/CDDP细胞胞核不规则,较大,有丰富的微绒毛。结论 本研究建立了稳定的人肺腺癌多药耐药细胞系(SPC-A-1/CDDP),可应用于下游实验。

关键词:人肺腺癌细胞;多药耐药
中图法分类号:R329.24;R734.2 文献标识码:A

Establishment of a multidrug resistance cell line from human lung adenocarcinoma cells and its biologic features

CHEN Jie, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun, XIONG Wei (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To establish a multidrug resistance cell line from human lung adenocarcinoma. **Methods** The human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1 was exposed to cisplatin of a high and then increasing concentration for 192 d to establish multidrug resistance cell line (SPC-A-1/CDDP). The relative resistance was tested with MTT assay. The morphology of the cells was observed with transmission and scanning electron microscopy and the chromosome of them was analyzed with Giemsa stained specimens. **Results** The resistance index of SPC-A-1/CDDP cells to cisplatin was 11.2 and the cells showed various cross-resistance to 5-Fu, doxorubicin, mitomycin, vincristine and etoposide, but not to hydroxycamptothecine. Electron microscopy showed the cells with irregular and enlarged nuclei and abundant microvilli. **Conclusion** A multidrug resistance cell line (SPC-A-1/CDDP) from human lung adenocarcinoma is established. It can be used to downstream experiment.

Key words: human adenocarcinoma cell; multidrug resistance

建立多药耐药细胞系是研究肿瘤多药耐药性(Multidrug resistance, MRD)的基础。顺铂(Cisplatin, CDDP)是肺癌化疗的基础药物之一,然而,在临床应用中,多数患者经化疗缓解后,肺癌细胞对顺铂产生了耐药性,影响了治疗效果,为探讨肺癌细胞对顺铂产生耐药性的机制,本实验以顺铂为诱导药物,人肺腺癌细胞系SPC-A-1为诱导对象,采用大剂量冲击与逐步增加剂量相结合的方法,诱导建立人肺腺癌多药耐药细胞系。

1 材料与方法

1.1 试剂

顺铂为昆明三成贵金属药业有限公司产品,丝裂霉素(Mitomycin)为浙江海正药业有限股份公司产品、阿霉素(Doxorubicin)深圳万乐药业有限公司产品、5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)为海普药业有限公司产品、长春新碱(Vincristin)上海华联制药有限公司产品、羟基喜树碱(Hydroxycamptothecine)为黄石飞云制药有限公司产品、足叶乙甙(Etoposide)为江苏恒瑞药业有限股份公司产品,化疗药物用无菌三蒸水稀释后-20 ℃保存,使用前按所需浓度稀释。二甲基四氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)为Sigma公司产品,RPMI-1640培养基和小牛血清为Hyclone产品,胰蛋白酶为GBICO产品。

1.2 细胞系与细胞培养

人肺腺癌SPC-A-1细胞系由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所胡义德博士后惠赠。细胞在含10%小牛血清、青霉素和链霉素各100 μg/ml的RPMI-1640培养液中,置于37 ℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中培养,0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3 多药耐药性的诱导

采用大剂量冲击与逐步增加剂量相结合的方法诱导。测定对顺铂的最低耐受浓度后,用终浓度为1 μl/ml的顺铂与SPC-A-1细胞共同培养24 h,以含最低顺铂耐受浓度的培养液培养7 d,待细胞稳定生长后传代,再次用1 μl/ml的顺铂培养24 h后,较高浓度的顺铂继续培养7~10 d,以后逐渐增加顺铂浓度,每次增加浓度之前,均用1 μl/ml的顺铂作用24 h,直至SPC-A-1细胞在1 μl/ml浓度下稳定生长和传代。

1.4 MTT检测药物敏感性[1]

将对数期生长的细胞接种于96孔培养板中,培养12 h后,弃去培养液,加入7种化疗药物,每种药物设4或5种浓度,每种浓度之间相差10倍,继续培养48 h;加入5 mg/ml的MTT 20 μl,4 h后,加入DMSO 200 μl,以490 nm为检测波长,测定各孔的光密度值,计算抑制率和50%抑制浓度(IC_{50})。

1.5 细胞生长曲线和倍增时间(Td)测定

将对数期生长的细胞,以1×10^5传代,于24、48、72、96、120 h计算细胞数,绘制细胞生长曲线,计算倍增时间。

基金项目:第三军医大学疾病基因基金资助;重庆市卫生局医学科研资助项目(00-2001)
作者简介:陈 杰(1964-),男,四川省泸州市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肿瘤多药耐药方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-11-05;修回日期:2001-01-12

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

1.6 形态学观察

在药物诱导过程中，倒置显微镜观察。透射电镜（JEOL-2000EX）和扫描电镜（AMRAY-1000B）按文献[2]进行。

1.7 染色体分析

按文献[3]进行。

2 结果

2.1 SPC-A-1/CDDP 的药物敏感性与多药耐药特性

经顺铂 192 d 的诱导，稳定传代 32 次，建立了人肺腺癌多药耐药细胞系 SPC-A-1/CDDP。MTT 检测结果表明，SPC-A-1/CDDP 对顺铂的耐药指数为 11.2，对 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、长春新碱和足叶乙甙等 5 种化疗药物有不同程度的耐药性，对羟基喜树碱无耐药性，见表 1。

表 1 SPC-A-1/CDDP 细胞耐药指数

Tab 1 The SPC-A-1/CDDP cell multidrug resistance index

Chemotherapeutic agents	$IC_{50}(\rho_B/\mu g \cdot ml^{-1})$		Multidrug resistance index
	SPC-A-1	SPC-A-1/CDDP	
Cisplatin	0.053	0.5936	11.2
Mitomycin	0.039	0.2301	5.9
Doxorubicin	0.027	0.2695	9.8
5-fluorouracil	0.180	2.6572	14.6
Vincristin	0.080	0.5760	7.2
Hydroxycamptothecine	0.079	0.0807	1.0
Etoposide	0.039	0.1950	5.0

2.2 细胞生长曲线和倍增时间

结果显示 SPC-A-1/CDDP 和 SPC-A-1 细胞增殖速度接近，倍增时间分别为 47.2 和 45.6 h，表明在产生耐药性后细胞增殖未受到抑制，见图 1。

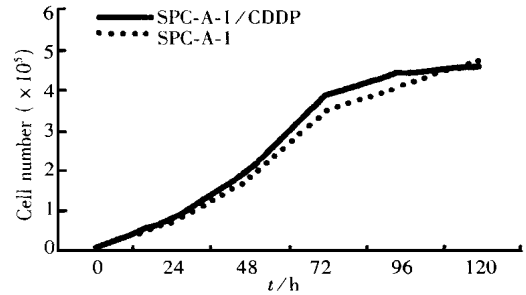


图 1 SPC-A-1/CDDP 和 SPC-A-1 细胞生长曲线

Fig 1 The growth curve of SPC-A-1/CDDP and SPC-A-1 cells

2.3 细胞形态与超微结构

光镜下 SPC-A-1/CDDP 细胞和 SPC-A-1 细胞均贴壁生长，SPC-A-1 细胞呈圆形和卵圆形，较小。SPC-A-1/CDDP 细胞较大，呈菱形和三角形；扫描电镜下 SPC-A-1 细胞呈圆形和卵圆形，表面平整，有少许指状突起，少量微绒毛，SPC-A-1/CDDP 细胞呈卵圆形或菱形，指状突起较多，微绒毛丰富，表面凹凸不平，见图 2。透射电镜下 SPC-A-1 呈圆形和卵圆形，细胞核呈卵圆形或不规则型，细胞膜有细长微绒毛；SPC-A-1/CDDP 细胞呈圆形和卵圆形，核大，呈分叶状，线粒体，粗面内质网增多，细胞表面突起明显，见图 3。

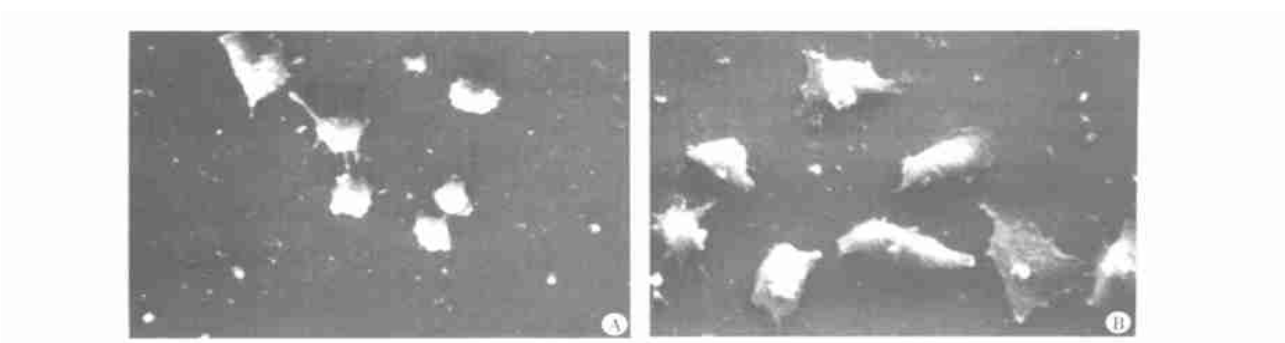


图 2 扫描电镜结果 （SEM× 795）

Fig 2 Results of scanning electron microscopy （SEM× 795）

A：SPC-A-1 cells；B：SPC-A-1/CDDP cells

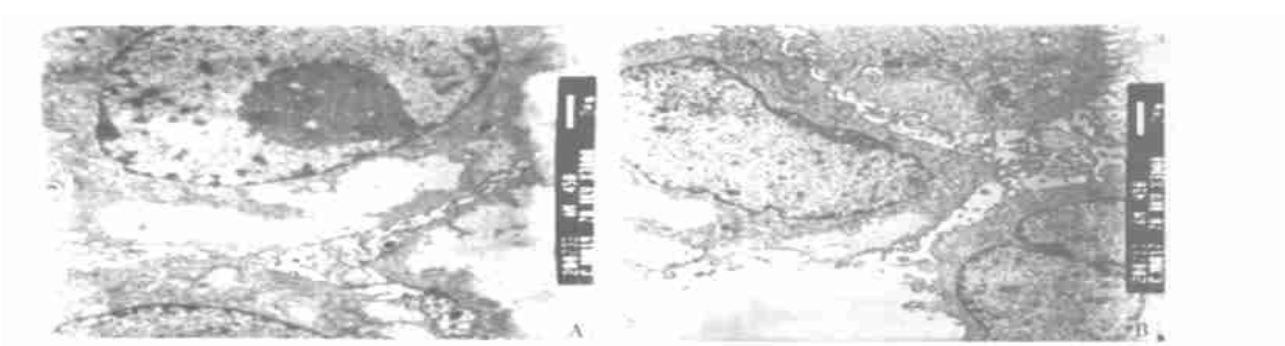


图 3 透射电镜结果 （TEM× 3 000）

Fig 3 Results of transmission electron microscopy （TEM× 3 000）

A：SPC-A-1 cells；B：SPC-A-1/CDDP cells

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

2.4　染色体分析

SPC-A-1/CDDP 细胞和 SPC-A-1 细胞染色体数目、大小无明显变化, 见图 4。

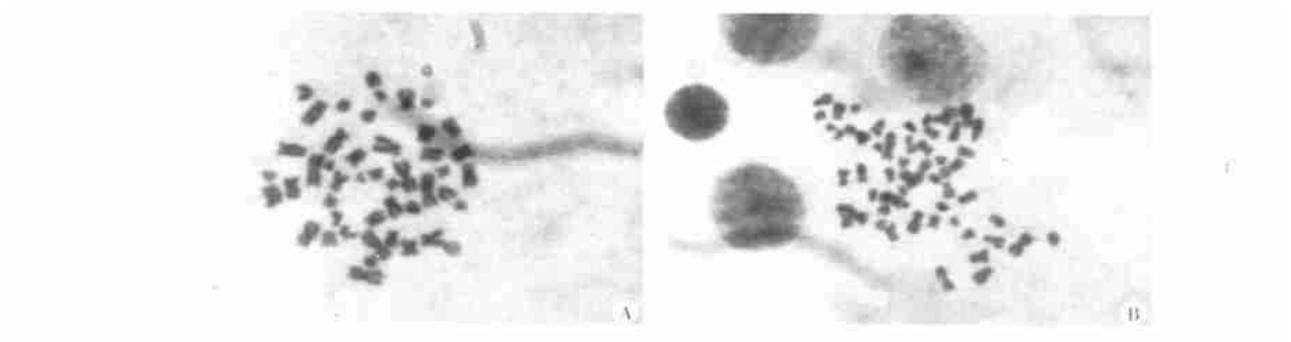


图 4　染色体分析结果　(吉氏染色× 1 000)

Fig 4　Results of the chromosome analysis　(Giemsa stain× 1 000)

A: SPC-A-1 cell; B: SPC-A-1/CDDP cell

3　讨论

体外建立多药耐药细胞系是研究肿瘤细胞产生多药耐药性机制的重要手段, 在细胞培养条件下应用抗癌药已成功地建立了包括白血病、卵巢癌、膀胱癌[3] 等多种 MDR 细胞系。目前大多采用逐步增加剂量法[4] 或大剂量冲击法进行诱导建株[5], 各有优缺点, 前者诱导时间长, 后者药物剂量不易控制。顺铂是肺癌化疗方案中的基本药物, 应用顺铂诱导建立的肺癌多药耐药细胞系具有代表性[6,7]。本研究采用大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方式, 以顺铂为诱导药物, 经过 192 d 的诱导, 建立了多药耐药细胞系。MTT 结果表明该细胞系对顺铂、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、长春新碱、和足叶乙甙等药物有不同程度的耐药性。但其相对耐药程度不同, 对 5—氟尿嘧啶的耐药性最强, 对足叶乙甙的耐药性最弱, 可能与药物的分子量、亲水亲脂性和作用机制有关[4]。生长曲线、倍增时间和形态学检测显示 SPC-A-1/CDDP 细胞性状稳定, 是可靠的人肺腺癌多药耐药细胞系, 可应用于下游实验, 同时提示大剂量冲击和逐步增加剂量相结合可缩短药物诱导时间。有研究表明阿霉素诱导的耐药细胞存在染色体畸变或重排现象[4], 但本研究的常规染色体检测未发现耐药细胞与亲代细胞间染色体的明显变化, 可能与检测方法的敏感程度有关, 采用 G 显带和核型分析有利于发现耐药细胞系的特征性改变。

(致谢: 衷心感谢第三军医大学附属西南医院病理学研究所卞修武教授在电镜阅片过程中的热情帮助和指导。)

参考文献:

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

[2] 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, 1(5): 421—423.

[3] 鄂　征 主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 164—169.

[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] 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.

[6] Oie H K, Russell E K, Carney D N, *et al*. Cell culture methods for the establishment of the NCI series of lung cancer cell lines[J]. J Cell Biochem Suppl, 1996, 24: 24—31.

[7] Nishio K, Nakamura T, Koh Y, *et al*. Drug resistance in lung cancer[J]. Curr Opin Oncol, 1999, 11(2): 109—115.

(编辑　王　红)

(上接 134 页)

解症[1,2], 在吸毒、酒醉、一氧化碳中毒及药物性自杀时可见, 与一般的安定中毒不同。非外伤性横纹肌溶解症诊断上除急性肾衰外还可有局部肌肉肿胀尤其受压部位肿胀现象, 严重时肿胀肢体可变硬、起水疱、破溃感染及丧失功能, 同时可伴有高尿酸血症、高血清肌酶及酱油尿。此类患者应尽快进行血液净化治疗, 其中血液灌流因可吸附循环中的药物和肌红蛋白, 效果尤其显著, 血液透析[2] 和腹膜透析也有效, 早期还可予利尿剂、阿片受体阻滞剂纳络酮[3] 等。治疗应按病情采取综合措施, ①注意肢体局部处理, 尤其是肌肉溶解严重时需尽快清除局部坏死组织及肿胀组织减压, 防止肌肉进一步坏死溶解。②控制感染。③纠正水电解质和酸碱平衡失调, 其中高血钾的抢救尤为重要。④碱化尿液。⑤注意保持气道通畅。

关键词: 多脏器功能障碍; 中毒; 安定

中图法分类号: R971.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 陈统清, 黄英伟. 非外伤性横纹肌溶解症致急性肾功能衰竭 3 例[J]. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(2): 113.

[2] 陈憬影, 陈胜生, 吴光苹, 等. 碳酸氢盐血透治疗横纹肌溶解相关急性肾衰: 附 2 例报告[J]. 福建医药杂志, 1998, 20(5): 76—77.

[3] Bell E F. The use of naloxone in the treatment of diazepam poisoning[J]. J Pediatr, 1975, 87(5): 803—804.

(编辑　薛国文)

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