DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.031
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

文章编号:1000-5404(2000)08-0787-03

论著

Hela/MMC细胞亚系的建立及其耐药机制的探讨

李 萍,陈 红,陈惠祯 (湖北医科大学附属二院妇产科和肿瘤科,武汉 430071)

提 要:目的 建立宫颈癌Hela/MMC耐药细胞亚系,并探讨其耐药机制。方法 以人宫颈癌Hela细胞为亲本,采用丝裂霉素连续性药物作用,间隙性增加药量,逐步提高药物浓度的方法,分离出MMC耐药亚系(Hela/MMC),并比较两种细胞生物学特性差异。结果 Hela/MMC细胞对MMC有5.02倍耐药,对DDP有2.03倍交叉耐药,对VCR、ADM和5-Fu保持敏感;耐药细胞核分裂指数增加;耐药细胞内丝裂霉素蓄积量比亲代细胞低32.64%($P<0.01$)。DNA链间交联指数降低51.91%($P<0.01$)。结论 耐药细胞Hela/MMC具有多药耐药特性且生长增殖能力强于亲代细胞,其对MMC耐药性与细胞内药物浓度降低和DNA链间交联减少有关。

关键词:药物耐受性;宫颈肿瘤;细胞系;丝裂霉素C
中图法分类号:R329.24;R915;R979.14 文献标识码:A

Study of establishment of Hela/MMC cell subline and its mechanism of drug-resistance

LI Ping, CHEN Hong, CHEN Hui-zheng (Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Objective To establish Hela/MMC cell subline of human cervical cancer and study the mechanism of its drug-resistance. Methods Hela cells of human cervical cancer were cultured with mitomycin C (MMC) in gradually increased dosage in order to obtain a drug-resistant Hela/MMC cell subline. The biological properties of Hela and Hela/MMC cells were compared and the mechanism of drug-resistance of Hela/MMC cells studied. Results Hela/MMC cells possessed the ability of 5.02 fold resistance to MMC and 2.03 fold cross-resistance to Capsulation (DDP) and maintain the sensitivity to vincristine (VCR), adriamycin (ADM) and 5-flurouracil (5-Fu). Mitotic index of the MMC-resistant cells was increased. Intracellular mitomycin accumulation was 32.64% lower in Hela/MMC cells than in Hela cells ($P<0.01$). DNA interstrand cross-link formation was reduced by 51.91% in Hela/MMC cells ($P<0.01$). Conclusion Hela/MMC cells are drug-resistant and have stronger proliferation than Hela cells. Its resistance to MMC might be due to the decrease of intracellular drug concentration and the DNA interstrand cross-links.

Key words: drug-resistance; cervical neoplasm; cell line; mitomycin C

我们以宫颈癌Hela细胞为亲本,分离筛选出耐丝裂霉素耐药亚系Hela/MMC,初步探讨了其生物学特性和耐药机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

宫颈癌Hela细胞由湖北省医学科学院病毒研究所提供。Hybri-care培养液由武汉大学生物保藏中心提供;丝裂霉素为日

基金项目:湖北省教委资助课题(960018)
作者简介:李 萍(1953-),女,湖北省武汉市人,副主任医师,副教授,主要从事妇科临床工作方面的研究,发表论文10篇。电话:(027)87317762
收稿日期:2000-01-05;修回日期:2000-04-25

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

本协和发酵工业株式会社产品；长春新碱(VCR)为上海第十二制药厂生产；阿霉素(ADM)是意大利爱宝制药厂生产；5-氟脲嘧啶为上海旭东海浦药业有限公司生产；顺铂(DDP)为中国齐鲁制药厂生产；溴化二甲噻唑二苯四氮唑(MTT)为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 耐药细胞分离及生物学特性研究。

1.2.1.1 Hela 细胞培养 Hela 细胞常规培养于 Hybri-care 培养基中，隔天换液 1 次，每周传代 2 次，细胞贴壁生长。

1.2.1.2 Hela/MMC 耐药亚系的分离 Hela 细胞培养液中加入 MMC 0.5 ng/ml，每 2～3 周递增 0.5 ng/ml 至 6.0 ng/ml，细胞于含 MMC 6.0 ng/ml 的培养液中贴壁生长良好 1 月，为 Hela/MMC 耐药亚系。进行下列每项生物实验前 1 周去药。

1.2.1.3 耐药性检测 采用 MTT 法，具体方法见文献[1]。

1.2.1.4 核分裂指数 将亲代和耐药细胞(1×10^5/ml)接种于有盖玻片的培养瓶中，按常规方法检测核分裂指数[2]。

1.2.2 Hela/MMC 细胞耐药机制研究

1.2.2.1 细胞内 MMC 蓄积量测定 采用高效液相色谱法(HPLC)[3]，①回收实验：取 1.0 ml 未处理细胞样液多份(1×10^6/ml)，加 8 μg/ml MMC 10、20、30、40、50 μl，加 2 ml 甲醇吹干，残渣以 PBS 定容 0.1 ml，取 2.0 μl 进 HPLC。以峰高对浓度作线性回归，回归方程为 C(ng/ml)＝0.138＋0.081H(mm)，r＝0.9933。②样品检测：亲代和耐药细胞培养 72 h 后，分别给 MMC 10、20、40 μl/ml，重复 4 次，1 h 后弃培养液，PBS 洗，胰酶消化，调细胞浓度为 1×10^6/ml，冻融法破碎细胞，取细胞样液 1 ml，按回收实验方法作高效液相色谱检测前处理，样品 MMC 浓度按回归方程计算而得。

1.2.2.2 DNA 链间交联检测 参照 Jong 法[4]。

2 结果

2.1 Hela/MMC 细胞耐药性

与亲代 Hela 细胞相比，Hela/MMC 细胞对 MMC 有 5.02 倍耐药，对顺铂有 2.03 倍交叉耐药，而对阿霉素、长春新碱及5-氟脲嘧啶保持敏感。该细胞在无 MMC 培养液中传代 4 个月，耐药性基本保持不变，见表 1。

表 1 **Hela 和 Hela/MMC 细胞对不同化疗药物 IC_{50}(nmol)**

Tab 1 IC_{50} of different drugs for Hela and Hela/MMC Cell line(nmol)

Cell line and resistance index	MMC	DDP	ADM	VCR	5-Fu
Hela	194.42	168.16	147.19	1.40	2995.80
Hela/MMC	975.10	341.36	110.39	1.10	1921.92
RI	5.02	2.03	0.75	0.79	0.64

2.2 核分裂指数见图 1

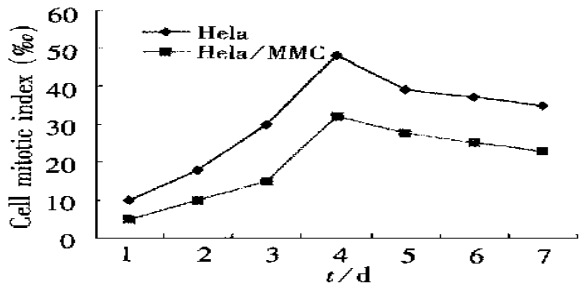


图 1 **Hela 和 Hela/MMC 细胞核分裂指数曲线**

Fig 1 Mitotic index curves of Hela and Hela/MMC cell line

2.3 Hela 和 Hela/MMC 细胞内 MMC 蓄积量，见表 2

表 2 **Hela 和 Hela/MMC 细胞内 MMC 蓄积量比较(nmol/10^6, $\bar{x}\pm s$)**

Tab 2 Cummulative value of intracellular mitomycin C in Hela and Hela/MMC cell line(nmol/10^6, $\bar{x}\pm s$)

MMC(μg/ml)	n	Hela	Hela/MMC
10	4	131.513±34.035	101.848±10.987
20	4	277.460±15.914	259.998±32.468
40	4	838.675±147.784	564.945±93.243 *

*: $P<0.05$ *vs* Hela cell

2.4 DNA 链间交联检测

Hela 细胞 DNA 链间交联指数为 13.10±1.39，耐药细胞为 6.30±1.04，比亲代细胞下降了 51.91%($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 耐药细胞亚系的建立及生物学特性

我们分离出的宫颈癌耐 MMC 耐药亚系 Hela/MMC 细胞对 MMC 有 5.02 倍耐药，对顺铂有 2 倍交叉耐药，但对 ADM、VCR、5-Fu 保持敏感，说明 Hela/MMC 细胞具有多药耐药特性，这对指导临床用药有意义。随着耐药性的产生，耐药细胞分裂指数增大，提示耐药细胞生长增殖能力增强，该现象在 Hela/DDP 耐药亚系中亦有发现[5]。Hela/MMC 耐药亚系将为进一步研究宫颈癌耐药机制和筛选有效的耐药逆转剂提供实验模型。

3.2 宫颈癌对 MMC 耐药机制初探

丝裂霉素主要通过使 DNA 交联致 DNA 合成抑制和介导自由基反应而发挥抗癌效应，其广泛应用于含宫颈癌在内的许多肿瘤，但耐药性的产生限制了它的临床应用。我们实验结果表明，Hela/MMC 细胞 DNA 链间交联百分数比亲代细胞降低了 51.91%，说明

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

DNA 链间交联减少与宫颈癌对 MMC 耐药有关, 这一现象在其它 MMC 耐药细胞如 P_{388} 白血病和膀胱癌细胞中也有发现[6,7], 但耐药细胞中 DNA 链间交联的减少是否是由于活化药物减少或由于受损的 DNA 修复增加, 有待进一步研究。本实验还发现, 耐药细胞内 MMC 蓄积量明显低于亲代细胞($P<0.05$), 提示细胞内抗癌药物蓄积量降低与宫颈癌对 MMC 耐药有关, 是否涉及其它耐药机制, 尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1): 55—58.

[2] 张静波 主编. 细胞生物学实用方法及技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995. 53—54.

[3] Singh S V, Xu B H, Maurya A K, *et al*. Modulation of mitomycin C resistance by glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1 137(2): 257—263.

[4] De Jong S. Detection of DNA cross-link in tumor cells with the ethidium bromide fluorescence assay[J]. Int J Cancer, 1986, 37(3): 557—561.

[5] 邱志华, 彭祥鄂. Hela/DDP 细胞亚系的建立及其耐药性改变的探讨[J]. 湖南医科大学学报, 1991, 16(1): 15—18.

[6] Xu B H, Singh S V. Effect of buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on cytotoxic activity of mitomycin C analogues BMY 25282 and BMY 25067[J]. Cancer Res, 1992, 52(12): 6 666—6 670.

[7] Xu B H, Gupta V, Singh S V, *et al*. Mechnism of differential sensitivity of human bladder cancer cell to mitomycin C and its analogue[J]. Br J Cancer, 1994, 69(7): 242—246.

(编辑　潘式文)

(上接 783 页)

1 例, 肝结核 1 例, 胆管结核 1 例, 网膜结核 1 例; 部份患者合并有腹外结核病史, 其中肺结核 2 例, 体表淋巴结结核 2 例。

1.7　误诊原因

6 例均被误诊, 分别为: 脾恶性淋巴瘤 4 例, 肝硬化、脾功能亢进 1 例, 甲型肝炎 1 例。

1.8　治疗及预后

4 例因诊断不明行剖腹探查而作脾切除术。6 例病人均给予正规抗痨治疗, 常用药物为链霉素、异烟肼、利福平三联治疗。经治疗后全部病人症状明显缓解, 各项实验室检查基本恢复正常。2 例患者脾脏大小恢复正常。经随访, 6 例患者均全部正常工作、生活。

2　讨论

由于脾脏结核很少见, 国内外目前仅见个案报道[1]。脾结核的传染途径有: 血行性、淋巴性、邻近器官结核病灶的扩散。近年来, 继发于获得性免疫缺陷综合症(HIV)的脾结核已见报道。本组 6 例中, 均有腹腔脏器结核病史, 故本组资料提示, 脾结核大多是继发于腹内邻近脏器结核病灶的扩散。

脾结核大多发于青壮年, Rescigno 及 Logroscino 对 3 954 例结核尸解分析, 发现脾结核的发病率随年龄增大有减低倾向, 10 岁以下为 51.8%, 11～20 岁 9.3%, 51～60 岁为 1.3%, 61 岁以上为 0%[2,3]。本组 6 例均为青壮年, 男女各半, 临床表现大多不典型, 主要表现为脾肿大、食欲下降、消瘦、腹痛、间歇性发热, 如合并胆胰管阻塞可出现梗阻性黄疸, 如合并有肝结核, 可出现肝细胞性黄疸。实验室检查大多无特异性, 部分病例可有血沉增快、血红素下降, 累及肝脏者可出现肝功能的损害。

影像学检查具有一定的辅助诊断价值。腹部平片可了解左上腹有无钙化斑点; B 超下表现为脾肿大、脾内可见单个或者多个不规则实质增强/减弱回声区; CT 表现为脾脏增大、脾门淋巴结肿大、脾内单个或多个低密度灶, 其内可见散在的点状钙化灶, 增强扫描后, 病灶无明显变化; 对于出现黄疸的患者, ERCP 可检查有无胆胰管的阻塞。脾结核的诊断比较困难, 大部分为术后诊断。腹腔镜检查因其创伤小、直视下可对病变部位进行活检而广泛应用于腹腔结核的诊断[2,4]。本组有 1 例患者腹腔镜下可见脾脏典型的结核表现, 并经病理证实。近年来随着介入医学的发展, 在 B 超或 CT 引导下脾脏细针穿刺活检技术对脾结核的诊断常可提供确诊依据, 只要患者无脾功能亢进表现, PT 及出凝血时间正常, 均可进行脾活检, 该方法不仅创伤小、诊断率高、并发症少, 而且可以反复多部位进行, 本组无病例行脾活检, 系因患者拒绝所致。此外, 对怀疑脾结核者进行诊断性治疗亦是一种有效的诊断手段。本组中有 1 例患者因经临床检查后排出脾脏其他疾病, 给予抗结核药治疗一个疗程后, 症状明显好转, 脾脏明显缩小而确立诊断的。剖腹探查常是临床上不仅能确诊的一种诊断方法, 同时亦可达到治疗目的[1]。本组 6 例中, 有 4 例是经剖腹探查并脾切除后活检确诊的。

治疗上, 国内有学者提出根据脾结核不同的病理类型采取不同的治疗措施, 粟粒型患者, 常规抗结核治疗可达目的; 对干酪坏死型患者, 因脾实质部分或大部分被干酪坏死组织代替, 抗结核药难以奏效, 应行手术治疗, 切除脾脏; 对以钙化为主的, 可以实施短期的抗结核治疗并进行临床观察[3]。

关键词: 结核; 脾脏
中图法分类号: R79　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 罗绍凯, 何伟雄, 洪文德. 13 例脾结核的诊断和治疗分析[J]. 中华内科杂志, 1996, 35(12): 832—833.

[2] 彭卫生, 王英年, 肖成志 主编. 新编结核病学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 267.

[3] 刘同伦 主编. 实用结核病学[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997. 457.

[4] al-Quorain A A, Facharzt, Satti M B, *et al*. Abdominal tuberculosis in Saudi Arabia: a clinico-pathological study of 65 cases[J]. Am J Gastroenterol, 1993, 88(1): 75—79.

(编辑　潘式文)

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