DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.014

人肺腺癌 A_{549}多重抗药细胞株生物学特性变化

胡义德* 钱桂生 陈维中 肖桃元** (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 探讨人肺腺癌 A_{549}多重抗药细胞株生物学特性变化。方法: 采用阿霉素(ADM)浓度递增的方法诱导人肺腺癌 A_{549}细胞系(A_{549}/P),在体外持续培养6个月,获得了具有多重抗药性的 A_{549}/R_2细胞,该细胞能在0.2μg/ml ADM下持续增殖。通过光镜和电镜观察其增殖及形态结构变化。结果: A_{549}/R_2细胞由巨大细胞增殖而来,其微绒毛、线粒体及分泌泡明显增加,有进一步分化趋向。结论: A_{549}/R_2细胞的进一步分化特征可能与其抗药性形成有关。

关键词 肺肿瘤;腺癌;抗药性
中图法分类号 R734.2

恶性肿瘤细胞的多重抗药性(Multidrug resistance, MDR)是导致临床肿瘤化疗失败的重要原因之一。目前,关于恶性肿瘤 MDR机理的研究已取得了一些进展[1,2],但有关抗药癌细胞的生物学特性的研究报道甚少。本实验采用阿霉素(ADM)在体外对人肺腺癌 A_{549}细胞系(A_{549}/P)进行逐步、长期诱导,获得了具有 MDR表型的细胞亚株 A_{549}/R_2[3]。与此同时,对该细胞亚株的生物学特性进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 药物

ADM为意大利 Farmitalia产品,按所需浓度用 RPMI-1640培养液稀释,-20℃冻存。

1.2 细胞系和细胞培养

A_{549}细胞系(美国建株)引自军事医学科学院。细胞培养在含有15%小牛血清、青-链霉素(各100 u/ml)的 RPMI-1640培养液中,置37℃、饱和湿度含5% CO_2和95%空气的孵箱中无菌培养。

1.3 抗 ADM人肺腺癌细胞亚株的建立

采用药物浓度递增诱导的方法建立抗 ADM的人肺腺癌细胞亚株[3]。该细胞亚株对 ADM、长春新碱(VCR)和足叶乙甙(VP-16)等药物产生了明显的抗药性。

1.4 病理观察

1.4.1 光镜观察 培养的活细胞经倒置生物显微镜观察。细胞涂片用95%乙醇固定后常规 HE染色,光学显微镜下观察。

1.4.2 扫描电镜观察 将培养细胞单层用0.125%胰蛋白酶消化,离心后取沉淀,用2.5%戊二醛前固定,2%锇酸 PBS溶液(pH7.40)后固定(4℃),充分分散细胞后涂片,乙醇丙酮梯度脱水,放入临界点干燥器中干燥喷金后用 T300型扫描电镜观察。

1.4.3 透射电镜观察 细胞块固定、脱水同扫描电镜标本制作,用 EPON-812环氧树脂包埋,LKBIII型切片机超薄切片,铀-铅双重染色后用 JEM-EX2000型透射电镜观察。

2 结果

2.1 A_{549}细胞系经 ADM诱导途径及细胞增殖变化

A_{549}细胞系经 ADM诱导,在体外连续培养178 d,稳定传代23次,获得了对 ADM、VCR、VP-16等多种抗癌药物均具有抗药性的细胞亚株 A_{549}/R_2。当 ADM浓度从0.0025μg/ml至0.2μg/ml递增时,A_{549}/P细胞呈轻度抑制到重度抑制状态,细胞体积明显增大,突起消失,增殖缓慢。继续间断在0.2μg/ml ADM下反复诱导培养,细胞获得了持续增殖能力,脱离 ADM后呈对数增殖,部分细胞重叠、集聚成团。0.125%胰蛋白酶消化分散时间由5 min延长至10 min。

2.2 A_{549}/R_2细胞的病理变化

2.2.1 光镜观察 A_{549}/P细胞大小不一,呈多角形;胞浆少,嗜酸性;核大而不规则,偏心位,核染质增加,核仁小而模糊。A_{549}/R_2细胞大小不一,呈多角形;胞浆较少,嗜酸性;核大而不规则,可见双核及裸核,核染质呈粒状,核仁1~2个,清晰可见。

2.2.2 扫描电镜观察 A_{549}/P细胞表面较平整,细胞周边突起较发达,胞体部微绒毛稀疏,见图1。而 A_{549}/R_2细胞表面高低不平,有许多粗短的指状突起,胞体部的细胞膜向外突起形成浓密的微绒毛和微褶样结构,有的微绒毛末端膨大形成球状突,见图2。

* 胡义德,男,31岁,主治医师、讲师,博士研究生
** 附属新桥医院病理科

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

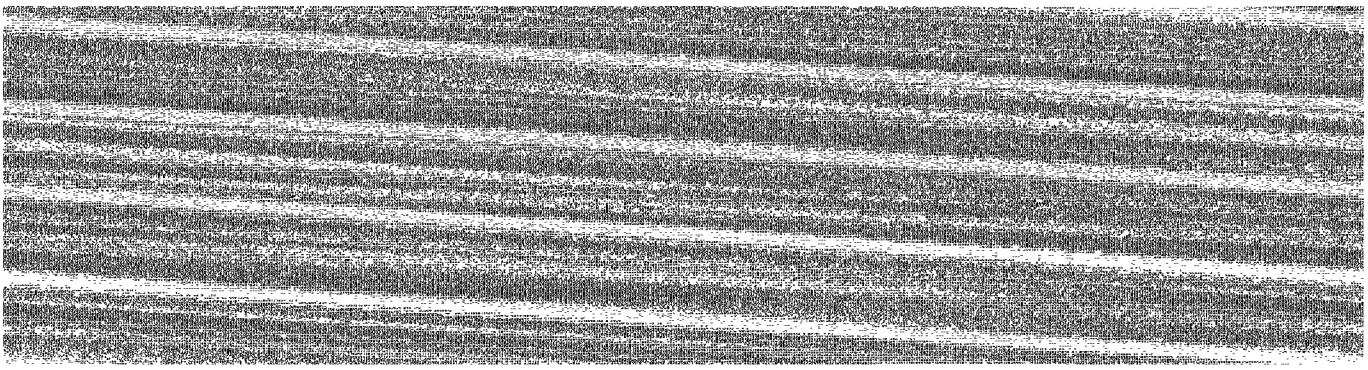


图1 A_{549}/P细胞 (SEM× 5000)
Fig 1 A_{549}/P cells (SEM× 5000)

图2 A_{549}/R_2细胞 (SEM× 5000)
Fig 2 A_{549}/R_2 cells (SEM× 5000)

2.2.3 透射电镜观察 A_{549}/P细胞呈椭圆形,核大,核膜明显内陷,常染色质较明显;细胞器不发达;细胞表面可见微绒毛,见图3 A_{549}/R_2细胞核大,异染色质增加,核仁巨大;细胞器发达,胞质中可见丰富的线粒体(Mi)和大量低电子密度的分泌泡(S);细胞表面可见丰富的微绒毛和胞质突(↓),见图4



图3 A_{549}/P细胞 (TEM× 6000)
Fig 3 A_{549}/P cells (TEM× 6000)

图4 A_{549}/R_2细胞 (TEM× 6000)
Fig 4 A_{549}/R_2 cells (TEM× 6000)

3 讨论

体内外药物诱导可使药物敏感的癌细胞产生抗药性。癌细胞与抗癌药物接触后,部分残余细胞对药物的敏感程度下降,这部分细胞增殖后就会影响整个癌细胞群对抗癌药物的敏感程度,甚至还会产生交叉抗药性,或MDR[3]。

癌细胞在体外经抗癌药物诱导筛选过程,实际上是一个细胞损伤性适应过程。由于ADM作用的非细胞周期特异性,决定了其量效关系呈剂量依赖性。因此,随着ADM浓度的增加,对癌细胞的损伤也就越严重。本研究发现,当ADM浓度在0.04μg/ml以下时,A_{549}细胞仅表现为增殖受抑,传代时间延长1倍;继续增大ADM浓度以后,则细胞损伤明显加重,大部分细胞死亡,残余活细胞胞体变大,且出现巨大细胞,细胞增殖缓慢,传代时间延长2倍。此现象符合ADM作用的量效关系。

目前,对MDR细胞增殖特性及结构变化研究尚不充分。Bieldler等[4]在建立中国仓鼠肺癌DC-3F/ADMDR细胞株时,测得两细胞株的群体倍增时间(Td)均为14 h,但发现MDR细胞单层排列规则,单位面积内细胞密度增大,甚至细胞集聚成团,细胞间粘附力增

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

强,须用较高浓度的胰蛋白酶才能使 MDR细胞脱落分散,且 MDR细胞的异体成瘤率下降。这些现象随着药物浓度提高,表现更明显。相反, Harker和 Twentyman等[5]分别在肉瘤和小细胞肺癌 MDR细胞中发现,抗药细胞 Td明显延长,其体外增殖率约为敏感细胞的 70%。本研究发现, A_{549}/R_2细胞 Td为 56.7 h,与 A_{549}/P(59.3 h)比较,差异不显著。但 A_{549}/R_2细胞单层有重叠、集聚现象,单位面积内细胞最大容量增加,表明细胞间的接触抑制有进一步消失,而且细胞间粘附力增强,用 0.125%胰蛋白酶消化分散时间延长 1倍,表明细胞外基质可能改变。光镜下两细胞结构无明显差异。但细胞超微结构显示, A_{549}/R_2细胞微绒毛发达,胞质突结构较明显,细胞器丰富,且胞浆中分泌颗粒明显增多,核异染质增加,表明抗药癌细胞有进一步分化的迹象,且胞质分化更明显。导致抗药癌细胞既呈一定恶性特征,但又有进一步分化趋向的原因尚不清楚。我们认为,除了癌基因信息控制细胞的增殖与分化外,还可能与细胞外基质的生物学作用有关。

由上可见, A_{549}/R_2细胞的进一步分化特性可能与其抗药性发生有关。此结论与"临床肿瘤化疗敏感性与癌细胞的分化程度呈负相关"的观点相一致。进一步分化的抗药细胞中丰富的分泌颗粒可将抗癌药物局限于非毒性区域,利用其中的药物代谢酶如谷胱苷肽 S-转移酶等,加速药物的代谢,或将药物外排增多,从而使细胞产生抗药性[6]。因此,对抗药癌细胞的生物学特性及病理改变的研究,有助于阐明 MDR的发生机理,为临床克服肿瘤的抗药性奠定了基础。

参考文献

1 Bosch I. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. Biochim Biophys Acta, 1996, 1288(2): 37

2 Bertino J R. Resistance machanisms to methotrexate in tumors. Stem cells, 1996, 14(1): 5

3 胡义德,钱桂生.人肺腺癌 A_{549}细胞系多重抗药性的形成.第三军医大学学报, 1994, 16(2): 103

4 Biedler J L, Rielm H, Peterson R H F *et al*. Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of Chinese hamster cells. J Natl Cancer Inst, 1975, 55: 671

5 Twentyman P R, Fox N E, Wright K A *et al*. Derivation and prelimilary characterisition of adriamycin resistant lines of human lung cancer cells. Br J Cancer, 1986, 53: 529

6 胡义德,钱桂生,金一尊.丁硫氨酸亚砜胺逆转多重抗药细胞的抗性作用及其作用机理的研究.第三军医大学学报, 1995, 17(5): 393

(收稿: 1996-10-18;修回: 1997-05-12)

(编辑　冷怀明)

Biological characterization changes of a multidrug-resistant strain of human lung adenocarcinoma cell line A_{549}

Hu Yide, Qian Guisheng, Chen Weizhong, Xiao Taoyuan (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To investigate the biological characterization changes of a multidrug-resistant strain of human lung adenocarcinoma cell line A_{549}. Methods: A multidrug-resistant strain of human lung adenocarcinoma cell line A_{549} was established through culturing A_{549} for 6 months with gradually increasing dosages of adriamycin. Then its proliferation and structural changes were observed with optical and electron microscopy. Results: The strain came from the giant cells and could further differentiate for the number of microvillians, mitochondria and secretory vacuoles in it was significantly increased. Conclusion: The characteristic of further differentiation of this strain might be related to its multidrug resistance.

Key words lung neoplasm; adenocarcinoma; drug resistance; ultrastructure

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