DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.026

人肺腺癌细胞系中 P-糖蛋白表达与抗药程度的关系

李 羲 郭先健 钱桂生 李淑平 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 630037

提 要 应用抗 P糖蛋白 (P-gp) McAb 4E3,采用免疫细胞化学方法,研究 P-gp在 A_{549}、PLA_{801}及 LC-3等 3种人肺腺癌细胞系中的表达,并检测这些细胞系对几种抗肿瘤药物的敏感性。结果显示, P-gp表达强弱与抗药程度相关。

关键词 肺肿瘤;细胞株; P糖蛋白;抗药性
中图法分类号 R734.2

化疗是肺癌综合治疗的主要措施之一,而肺癌的抗药性常使化疗失败。非小细胞肺癌 (NSCLC)是一大类具有内在抗药性的肿瘤[1],而在 NSCLC中,腺癌的抗药程度又高于鳞癌及大细胞癌。即使是同一类型的肺癌,其抗药程度亦具有个体差异。产生这种差异的机理目前尚未明了。P-糖蛋白 (P-gp)是位于肿瘤细胞浆膜的药物排出泵,与肿瘤的抗药性有关。我们推测 P-gp亦可能与肺癌抗药性的个体差异有关,因此本实验研究 P-gp在 3种人肺腺癌细胞系中的表达,试图探讨它与抗药性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞系与细胞培养

人肺腺癌细胞系 A_{549}、PLA_{801}及 LC-3均贴壁生长。细胞接种于 50 ml培养瓶,加入 RPMI 1640培养液 (含 10%小牛血清、青霉素、链霉素各 100 u/ml) 6 ml,置 37℃, 5% CO_2培养箱培养,每 3天更换培养液,待细胞长满时,以 0.25%胰酶消化传代。

1.2 抗 P-gp McAb免疫细胞化学染色

将细胞培养于玻片上,待其基本长满时取出玻片,室温晾干, 4%多聚甲醛固定 20 min, PBS (pH 7.20)洗 5 min, 0.5% H_2O_2-甲醇室温浸泡 20 min,水洗 5 min, PBS洗 5 min,加正常马血清, 37℃孵育 1 h;加抗 P-gp McAb 4E3(美国 Arceci博士惠赠), 37℃孵育 1 h; PBS洗 5 min, 3次;加 BioH/M, 37℃孵育 1 h; PBS洗后加 ABC, 37℃ 1 h; PBS洗 3次; DAB显色。显色后,胞膜、胞浆出现棕黄色颗粒状着色为染色阳性。根据着色强度分为强 (+++)、中 (++)、弱 (+) 3级,未着色者为染色阴性 (-)。

1.3 药物敏感性测定

采用药物为阿霉素 (ADM)、顺铂 (CDDP)、长春新碱 (VCR)、鬼臼乙叉甙 (VP-16)。在 24孔细胞培养板按每孔 4×10^4细胞分别加入 A_{549}、PLA_{801}及 LC-3细胞。静置培养 6 h后,加入不同浓度的抗肿瘤药物,于 37℃、5% CO_2条件下继续培养 72 h,以台盼蓝染色行活细胞计数,计算各种药物的半数抑制浓度 (IC_{50})、抗药指数 (Resistant factor, RF)。

2 结果

2.1 P-gp表达

免疫细胞化学染色结果显示, A_{549}细胞中度表达 P-gp(++)见图 1, PLA_{801}弱至中度表达 (+~++)见图 2, LC-3细胞染色阴性 (-)。表明不同的肺腺癌细胞系 P-gp表达具有明显差异。

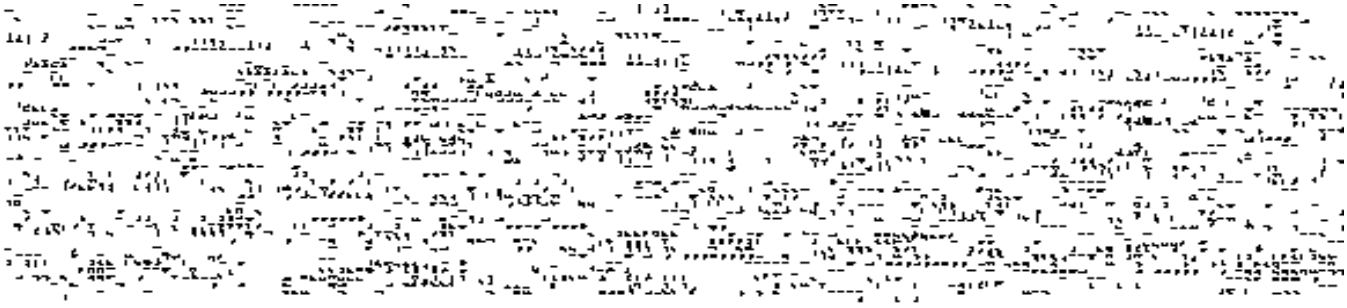


图 1 A_{549}细胞 P-gp免疫细胞化学染色 (ABC×200)

Fig 1 Immunocytochemical staining of P-gp in A_{549} cells (ABC×200)

图 2 PLA_{801}细胞 P-gp免疫细胞化学染色 (ABC×200)

Fig 2 Immunocytochemical staining of P-gp in PLA_{801} cells (ABC×200)

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

2.2　药物敏感性

药物敏感性检测结果显示, A_{549}细胞的抗药程度高于 PLA_{801},后者又高于 LC-3,见附表。

附表　3种细胞系药物敏感性测定结果

Table　The results of drug sensitivity assay of three cell lines

	$IC_{50}(\rho_B/\mu g \cdot ml^{-1})$		RF	$IC_{50}(\rho_B/\mu g \cdot ml^{-1})$		RF
	A_{549}	PLA_{801}		PLA_{801}	LC-3	
ADM	0.063	0.052	1.21	0.052	0.0275	1.89
CDDP	0.137	0.124	1.10	0.124	0.088	1.40
VCR	0.413	0.320	1.29	0.320	0.189	1.69
VP-16	0.214	0.109	1.96	0.109	0.039	2.79

3　讨论

在肺癌的综合治疗中,化疗为主要的措施之一。然而,由于肺癌细胞的抗药性,尤其是多药抗药性(Multidrug resistance, MDR),常使化疗失败。这种抗药性可原发地存在,称内在抗药性(Intrinsic resistance),亦可在化疗后产生,称为获得抗药性(Acquired resistance)。小细胞肺癌(SCLC)通常对初始化疗敏感,但化疗后可产生抗药性。NSCLC是一大类具有内在抗药性的肿瘤。在 NSCLC中,抗药程度又随细胞类型不同而异。即使是同一类型的肺癌,其抗药程度亦有个体差异。产生这种差异的原因,目前尚未明了。Volm等[2]发现,P-gp表达与 NSCLC在体外对 ADM的抗药性相关。据此推测,NSCLC抗药程度的个体差异可能与 P-gp表达有关。本文结果显示 A_{549}细胞中度表达 P-gp, $P\text{-}A_{801}$细胞弱至中度表达,而 LC-3细胞染色阴性,表明肺腺癌细胞系 P-gp表达具有明显差异。通过比较这些细胞系的药物敏感性可见, A_{549}细胞的抗药程度高于 $P\text{-}A_{801}$,后者又高于 LC-3细胞,提示 P-gp表达强弱与肺腺癌细胞的抗药程度相关。P-gp为一能量依赖性药物排出来泵,它水解 ATP释放能量,并在 Mg^{2+} 作用下,与细胞内抗肿瘤药物结合,并转运到细胞外,从而使细胞内药物浓度降低,产生抗药性[3,4]。在 P-gp浓度高的肿瘤细胞,其药物转运作用可能较强,反之,则可能较弱。在肺癌化疗中,通过纤维支气管镜或其他途径获取肺癌细胞,检测其 P-gp表达与药物敏感性,可能有助于选择正确的化疗方案,提高疗效。

参考文献

1 Shin H J, Lee J S, Hong W K *et al*. Study of multidrug resistance (mdr1) gene in non-small-cell lung cancer. Anticancer Res, 1992; 12(2): 367

2 Volm M, Mattern J, Samsel B. Relationship of inherent resistance to doxorubicin, proliferative activity and expression of P-glycoprotein 170 and glutathione S-transferase-π in human lung tumors. Cancer, 1992; 70(4): 764

3 Naito M, Hamada H, Tsuruo T. ATP/Mg^{2+}-dependent of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistant K_{562} cells. J Biol Chem, 1988; 263(24): 11887

4 Ling V. P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs. Cancer, 1992; 69(10): 2063

(收稿: 1996-03-20;修回: 1996-10-18)

(编辑　冷怀明)

A study of the relationship between P-glycoprotein expression and drug resistance in human lung adenocarcinoma cell lines

Li Xi, Guo Xianjian, Qian Guisheng, Li Shuping (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hoapital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract　P-glycoprotein (P-gp) expression in three human lung adenocarcinoma cell lines of A_{549}, PLA_{801} and LC-3 and the resistance of the three cell lines to anticancer drugs were detected with immunocytochemical assay using P-gp McAb $4E_3$. It was indicated that the degree of P-gp expression was correlated to drug resistance.

Key words　lung neoplasms; cell line; P-glycoprotein; drug resistance

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