DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.02.010

人肺腺癌A549细胞系多重抗药性的形成

胡义德 钱桂生 (第三军医大学新桥医院呼吸内科) 630037

提 要 本文采用阿霉素(ADM)逐步诱导人肺腺癌A549细胞系,在体外持续培养6个月,获得了具有抗药性的A549/R_2细胞,该细胞能在0.2 μg/ml ADM下持续增殖。通过测定抗癌药物作用的50%抑制浓度(IC_{50})发现,A549/R_2细胞对ADM的抗药性为A549的7～118倍,同时对表阿霉素(4－epi)、长春新碱(VCR)、足叶乙甙(VP－16)也具有显著抗药性,对氮芥(NH_2)、丝裂霉素(MMC)和卡铂(KP)低度抗药,对5-氟脲嘧啶(5－Fu)、氨甲喋呤(MTX)和平阳霉素(BLM－A_5)无抗药性。A549/R_2细胞在脱离ADM诱导第4周时,抗药性约下降30%,至第8周IC_{50}降至0.0693 μg/ml,但仍是敏感细胞的20倍。结果表明:A549/R_2细胞具有多重抗药性(MDR)表型,且抗药性较稳定,因此它是研究人肺腺癌MDR机制和筛选抗药性逆转剂的理想模型。

关键词 肺肿瘤;腺癌;抗药性;阿霉素

中图法分类号 R915;R730.5

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[1,2]。目前,关于恶性肿瘤MDR机制的研究已取得了一些进展[3,4],但有关肺癌尤其是非小细胞肺癌MDR特性的探讨,国内外研究甚少。本文用阿霉素(adriamycin,ADM)在体外对人肺腺癌A549细胞系进行逐步、长期诱导,获得了具有MDR表型的细胞模型,为进一步研究人肺腺癌MDR机制和筛选抗药性逆转剂提供了实验工具。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞系和细胞培养

A549细胞系(美国建株)引自军事医学科学院。对照采用人小细胞肺癌NCI－H69细胞系和人肺巨细胞癌PLA801细胞系细胞均培养在含有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。

1.2 A549细胞系抗药性的形成

采用药物浓度递增诱导的方法建立抗ADM的A549抗药细胞模型[5]。具体诱导途径是:A549细胞系经0.0025～0.02 μg/ml ADM持续诱导培养40 d后,将ADM浓度提高到0.04 μg/ml,间歇给药诱导培养72 d,然后,ADM浓度再依次加倍,直到该细胞能在0.2μg/ml ADM浓度下稳定增殖并产生抗药性。抗药细胞在进行指标检测前1周去ADM培养。

1.3 药物

ADM和表阿霉素(4－epi)均为意大利Farmitalia产品,按所需浓度稀释,－20℃冻存;丝裂霉素C(MMC)为日本协和发酵(Kyowa Hakko)产品;其余抗癌药物:长春新碱(VCR)、平阳霉素(BLM－A_5)、氮芥(NH_2)、足叶乙甙(VP－16)、5－氟脲嘧啶(5－Fu)、氨甲喋呤(MTX)和卡铂(KP)均为国产,使用时用培养液配制。

1.4 细胞增殖曲线及群体倍增时间(Td)测定

在24孔细胞培养板中,每孔接种5.2×10^4细胞,分别于第3、5、7、9、11天用台盼蓝染色行活细胞计数,每次计数3个孔,取均数,绘制细胞增殖曲线,按Patterson氏公式 $Td=(T\cdot lg2)/(lgN/N_0)$计算细胞在对数增殖期的Td。

1.5 IC_{50}测定[6]

在24孔细胞培养板中,每孔接种4×10^4细胞,静置培养6 h后加入适当浓度的药物(每种药物设4～6个浓度点,两相邻浓度间相差10倍),加入等体积无菌Hank's液设对照孔,第3天培养液加倍,第6天用台盼蓝染色行活细胞计数,计算每种药物各浓度作用下的细胞生长抑制率。

$$细胞生长抑制率=\frac{对照孔活细胞数-加药孔活细胞数}{对照孔活细胞数}\times 100\%$$

采用直线回归法推算药物作用的50%抑制浓度即IC_{50}。用抗药细胞的IC_{50}值除以其敏感细胞的IC_{50}值,结果为抗药指数(resistant factor,RF)。

2 实验结果

2.1 一般特性

A549细胞系经ADM诱导,在体外连续培养6个月,稳定传代23次,结果该细胞能在0.2 μg/ml ADM浓度下持续增殖,此浓度下的A549活细胞单层有重叠、聚集现象。为便于比较,我们将A549亲代敏感细胞命名为A549/P,将0.04 μg/ml ADM浓度下的抗药细胞命名为A549/R_1,将0.2 μg/ml ADM浓度下的抗药细胞命名为A549/R_2。

细胞体外增殖曲线显示,A549/P和A549/R_2细胞均于第9

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

天达到峰值，但A549/R_2细胞曲线峰值明显增高，曲线下降平缓(图1)；而两细胞的群体倍增时间分别为59.3和56.7 h，两相差不明显。

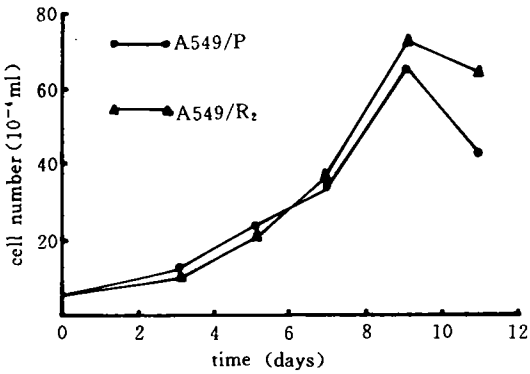


图1 A549/P和A549/R_2细胞体外增殖曲线

Fig 1 Growth curves of A549/P and A549/R_2 cells in vitro in the absence of ADM

Each point indicates the mean data from 3 experiments.

2.2 各种人肺癌细胞系对ADM的剂量效应关系

ADM对A549/P、NCI－H69、PLA801各细胞系作用的IC_{50}值相近，分别为0.0044 μg/ml、0.0091 μg/ml和0.0108 μg/ml，而ADM对A549/R_2细胞作用的IC_{50}值明显增大，达到0.1517 μg/ml(图2)。

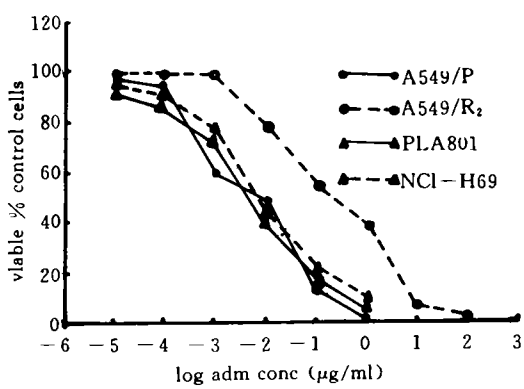


图2 各种人肺癌细胞系对ADM的剂量效应

Fig 2 Dose-response of various human lung cancer cell lines to ADM

Each point represents the count of cells from a single dish.

2.3 A549抗药细胞对ADM的药物敏感性变化(见表1)

表1 A549抗药细胞对ADM的相对抗药性

Tab 1 Relative resistance of ADM-resistant variants of A549 to ADM

Drug	IC_{50} (μg/ml)			Resistant factor (RF)★
	A549/P	A549/R_1	A549/R_2	
ADM	0.01467	0.10800	—	7.4
	0.01142	0.15260	—	13.4
	0.01157	0.09725	—	8.4
	0.00767	0.17440	—	22.7▲
	0.00443	—	0.07013	15.8
	0.00443	—	0.15170	34.2
	0.00443	—	0.05257	11.9
	0.00799	—	0.11160	14.0
	0.00818	—	0.61190	74.8
	0.00756	—	0.13100	17.3
	0.00762	—	0.39540	51.9
	0.00225	—	0.26710	118.5▲▲

★：RF＝IC_{50}(Resistant line)/IC_{50}(Parental line)

▲：$\bar{x} \pm s = 13 \pm 6.99$ of A549/R_1

▲▲：$\bar{x} \pm s = 42.3 \pm 37.93$ of A549/R_2

2.4 A549抗药细胞对其它抗癌药物敏感性变化(见表2)

表2 A549抗药细胞对其它抗癌药物的相对抗药性

Tab 2 Relative resistance of ADM-resistant variants of A549 to other anti-cancer drugs

Drug	IC_{50} (μg/ml)			Resistant factor
	A549/P	A549/R_1	A549/R_2	
4－epi	0.01589	0.09974	—	6.3
	0.02110	0.09245	—	4.4
	0.00765	—	0.03254	4.3
	0.00667	—	0.06893	10.3
VCR	0.07500	1.44800	—	19.3
	0.14400	3.68400	—	25.6
	0.01000	—	0.89100	89.1
	0.00500	—	3.83600	767.2
VP－16	0.89000	2.30900	—	2.6
	0.45100	0.54300	—	1.2
	0.55300	—	3.30700	6.0
	0.69500	—	4.30000	6.2
NH_2	0.03331	0.01647	—	0.5
	0.05610	0.03907	—	0.7
	0.03506	—	0.08519	2.4
	0.01786	—	0.05687	3.2
5－Fu	16.25000	—	7.53000	0.5
	23.73000	—	17.72000	0.7
MMC	0.01030	—	0.02116	2.1
	0.01853	—	0.02934	1.6
BLM－A_5	0.80190	—	0.57500	0.7
	0.20880	—	0.32120	1.5
KP	1.44300	—	3.50900	2.4
	0.85900	—	3.19000	3.7
MTX	0.04079	—	0.04149	1.0
	0.05236	—	0.03740	0.7

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

2.5 A549/R_2细胞对ADM抗药特征的稳定性

A549/R_2细胞在脱离ADM诱导第4周时(与ADM持续诱导的A549/R_2细胞比较)，其抗药性可保持在70%以上；至第8周，IC_{50}值下降至0.0693 μg/ml，但与亲代敏感细胞比较，抗药指数为20.4，仍具有较强的抗药性。

3 讨论

应用蒽环类抗癌抗生素如ADM在体外诱导癌细胞产生抗药性，已成为肿瘤抗药性研究的重要途径。过去，其主要选择对象是啮齿类动物起源的白血病细胞和腹水瘤细胞。70年代后，由于恶性肿瘤MDR现象的发现，人们以ADM为代表性诱导剂，成功地建立了人类起源的各种抗药癌细胞系，包括白血病、卵巢癌、小细胞肺癌抗药细胞系等[5,7,8]。这些抗药癌细胞不仅对ADM具有抗药性，而且对许多其它结构和功能均不同的抗癌药物也产生了抗药性。这种离体抗药细胞模型，较好地模拟了人类肿瘤化疗后常发生的相似抗药性。因此，应用体外抗药细胞模型来研究肿瘤抗药性发生机理具有实际意义，而成功建立抗药细胞模型则是深入研究的重要前提。

本文首次应用ADM诱导人肺腺癌A549细胞系，在体外持续培养6个月。该细胞能在0.2 μg/ml ADM浓度下持续增殖。细胞体外增殖曲线表明，A549抗药细胞的体外增殖活力与其亲代敏感细胞相近似；但单位面积内A549抗药细胞的最大容量明显增加，与其活细胞单层的重叠、聚集现象一致，提示A549抗药细胞的接触抑制可能有一定程度消失。各种人肺癌细胞系对ADM的剂量效应曲线显示，ADM对3种不同类型的肺癌细胞系作用的IC_{50}值相近，但对A549/P细胞作用的IC_{50}值最小，表明亲代A549细胞系对ADM十分敏感；而ADM对A549/R_2细胞作用的IC_{50}值明显增大，提示亲代A549细胞系经长期ADM诱导后获得了抗药性。

由表1和2可见，与其亲代敏感细胞比较，A549/R_2细胞对ADM的抗药性为A549细胞的7～118倍，同时，还对ADM的衍生物4－epi产生交叉抗药性，除此之外，对天然产抗癌剂VCR和VP－16也具有明显抗药性。此结果与其它典型的MDR细胞系的抗药表型极为相似[4,5]。但是，A549/R_2细胞还具有自己的抗药特点，表现为对NH_2、MMC和铂类化合物卡铂(KP)有低度抗药性，而对抗代谢类抗癌剂5－Fu、MTX和抗癌抗生素BLM－A_5仍保持与亲代细胞相同的敏感性。这与Twentyman和Mirski等[5,9]报道的小细胞肺癌MDR细胞的抗药谱存在一定差异，这可能与癌细胞类型不同有关。同时，也表明不同细胞类型肺癌的抗药表型也有差异。

细胞抗药特征的稳定性，可以判断抗药细胞模型的理想程度。本实验对A549/R_2细胞抗药特征的稳定性进行测定结果表明，该细胞在脱离ADM诱导4周时，其抗药性虽有下降，但可保持在70%以上，基本稳定；至第8周，其IC_{50}值下降至0.0693 μg/ml，但与亲代敏感细胞相比，仍具有较强的抗药性。此结果与国外报道的典型的MDR细胞模型抗药性的稳定性基本一致[5,9]。

综上所述，A549/R_2细胞具有多重抗药表型，而且其抗药性较稳定，因此，它是研究人肺腺癌MDR机制的理想模型，也是筛选抗药性逆转剂的理想工具。具体研究尚在进行之中。

参考文献

1 Ling V. P－glycoprotein and resistance to anticancer drugs. Cancer，1992，May 15，69：2603～2609

2 Curt GA，Cendeninn NJ，Chabner BA. Drug resistance in cancer. Cancer Treat Rep，1984，68：86～99

3 Bradley G，Juranka PF，Ling V. Mechanism of multidrug resistance. Biochemica Biophys Acta，1988，948：87～128

4 Gerlach JH，Kartner N，Bell DR，et al. Multidrug resistance. Cancer Surv，1986，5：25～46

5 Twentyman PR，Fox NE，Wright KA，et al. Derivation and prelimiary characterisation of adriamycin resistant lines of human lung cancer cells. Br J Cancer，1986，53：529～537

6 Danks MK. Atypical multiple drug resistance in a human leukemic cell line selected for resistance to Teniposide (VM－26). Cancer Res，1987，47：1297～1302

7 Bhalla K，Hindenburg A，Taub KN，et al. Isolation and Characterization of an anthracycline-resistant human leukemic cell line. Cancer Res，1985，45：3675～3682

8 Rogan AM，Hamilton TC，Young KC，et al. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. Science，1984，224：994～996

9 Mirski SEL，Gerlach JH，Cole SPC. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in ADM. Cancer Res，1987，may 15，47：2594～2598

(收稿：1993-06-28；修回：1994-02-18)

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

Establishment of a human lung adenocarcinoma cell line A549 with multidrug resistance

Hu Yide, Qian Guisheng (Department of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630037)

Abstract A multidrug resistant variant ($A549/R_2$) of human lung adenocarcinoma cell line A549 was established through culturing the cells gradually increasing dosages of adriamycin (ADM) up to a final dosage of 0.2 μg/ml in a period of 6 months. It was found that the cells, after culture, were 7～118 times more resistant of ADM than the parent cells (A549/P) at IC_{50}. Besides, $A549/R_2$ was resistant to epirubicin, vincristine, and etoposide, and relatively resistant to mustin, mitomycin C and carboplatin, but not resistant to 5－fluorouracil, methotrexate or bleomycin－A_5. When $A549/R_2$ was further cultured without ADM, there wrould be a 30% reduction of drug resistance in 4 weeks and a progressive reduction would occur when the culture proceeded on for 8 weeks though its IC_{50} (0.0693 μg/ml) was 20－fold higher than that of A549/P. These findings indicate that $A549/R_2$ expresses the phenotype of multidrug resistance with relative stability and can serve as an ideal model for the study of multidrug resistance in human lung adenocarcinoma.

Key words lung neoplasms; adenocarcinoma; drug resistance; doxorubicin

腹会阴直肠癌根治性切除术骶前静脉大出血的防治体会(附5例报告)

蔡志民 马宏敏 (第三军医大学西南医院普外科) 630038

骶前出血是直肠切除术中严重医源性损伤。国内文献报道平均发生率为2.9%，平均病死率为13%[1]。我院自1975年～1990年间，直肠癌手术中发生骶前大出血5例，现报道如下。

1 临床资料

本组5例。男性3例，女性2例。年龄最大的63岁，最小的34岁。平均为51.6岁。直肠下段癌3例，中、上段癌各1例。术中骶前出血4例，骶尾部同时出血1例。出血量最多2 000 ml，最少1 200 ml。出血原因：解剖变异1例，肿瘤与骶前筋膜粘连2例。手术中粗暴致伤1例。原因不明1例。止血方法：用妇科沙条填塞止血2例。电凝加缝扎止血1例。明胶海绵压迫图钉压迫1例。凡士林纱布填塞压迫止血1例。拔引流条时间3～6 d。住院时间6～42 d。4例痊愈出院，1例术后第6天死于感染。

2 讨论

骶前静脉破裂大出血多发生在直肠癌根治术时。究其原因主要有解剖变异，手术时解剖关系不清；分离直肠时未在骶前筋膜与直肠固有筋膜之间进行，太靠近骶骨膜分离；手术操作粗暴，破坏了正常间隙。本组5例中，由于手术粗暴所致一例，解剖关系不清一例，肿瘤与骶前筋膜粘连强行分离所造成2例。本组3例属直肠下段癌，中段与上段癌各1例。我们认为在做直肠下段癌根治性切除时尤应警惕骶前出血的发生。止血方法：目前国内对骶前出血采取了多种止血方法。如止血钉、电凝、骨泥填压等。但据文献报道仍以纱布条填塞止血效果较好。我院5例中4例采用填塞止血而凑效。预防措施：我们的经验，在施行腹会阴直肠癌根治性切除术游离直肠时应解剖清楚，分离在直视下用锐器施行。直肠固有筋膜与骶前筋膜之间之粘连带、索，应在直视下切断结扎。不做强行分离，以免撕破骶前静脉。如遇出血，不要用止血钳夹夹血管止血，以免撕脱，造成难以控制的大出血。有作者提出，对骶前静脉枝出血，采用缝扎及盆底填塞等方法可获止血。粗口径骶前静脉出血可采用止血钉对破裂出血处静脉嵌钉入骨质止血[2]。我院5例中有一例采用图钉嵌入骨质压迫止血获得成功。

关键词 直肠肿瘤/外科手术；骶前出血

中图法分类号 R735.37

参考文献

1 周颜才. 实用外科杂志，1992，3(12)：403

2 王钦尧. 腹部外科进展. 成都：四川科学技术出版社，1992，4：150

(收稿：1993-11-30；修回：1994-02-22)

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