



## 人大肠癌多药耐药细胞LoVo/5-FU的建立及其生物学特性的初步研究

大肠癌临床化疗失败的主要原因之一，是由于化疗过程中肿瘤细胞产生多药耐药(Multidrug-resistance, MDR)。MDR细胞株是研究MDR和逆转MDR的理想模型。自1988年Broggini 等[1]建立结肠癌耐药细胞株以来，国内外一系列细胞株相继建立[2][3][4]，并在此基础上做了大量研究工作，但国内尚未见到人大肠癌LoVo/5-FU细胞株方面的报道。我们用5-氟尿密啶(5-FU)对LoVo细胞进行了长期诱导，历时6个月，经筛选获得了一个MDR细胞株，并对其生物学特性进行了研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞株

LoVo细胞引自第一军医大学病理教研室。

#### 1.2 药物及试剂

氟脲嘧啶(5-FU, 上海海普药业有限公司)、丝裂霉素(MMC, 日本发酵工业株式会社)、阿霉素(ADM, 日本协和医药有限公司)、顺铂(DDP, 锦州制药一厂)、氨甲喋呤(MTX, 上海第十二制药厂)、阿糖胞苷(AraC, 上海第十二制药厂), 配成100×保存液, -20℃分装保存; 噻唑蓝(MTT, Sigma公司)、原位DNA末端转移酶标记试剂盒(德国宝灵曼公司), LSAB试剂盒购自北京中山生物技术公司。

#### 1.3 RPMI-1640培养液

该培养液为美国GIBCO公司产品。10.4 g粉剂加三蒸水至1 000 ml, 内含NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g, HEPES 2.7 g, 青霉素、链霉素各100 U/ml。0.22 μm微孔滤膜过滤除菌, 4℃保存, 使用前加入灭活新生小牛血清, 使其浓度为15%。

#### 1.4 诱导培养方法

LoVo细胞在含有15%灭活新生小牛血清(杭州四季青公司)的1640培养液中, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的细胞培养箱中无菌培养。当细胞处于对数生长期时, 置2.5 μg/ml 5-FU中作用1 h, 1640培养液冲洗2次。1个月后, 当细胞处于对数生长期时, 再次用2.5 μg/ml 5-FU处理和1640培养液冲洗, 如此反复诱导, 历时约6个月, 至LoVo细胞可以长期在2.5 μg/ml 5-FU培养液中生长。

#### 1.5 一般形态学观察

使LoVo和LoVo/5-FU细胞在载玻片上生长, 常规HE染色, 光镜下观察并摄片。

#### 1.6 生长曲线测定

对数生长期LoVo和LoVo/5-FU细胞消化后移入离心管, 配制成10<sup>5</sup> /ml细胞悬液, 接种于6孔培养板中, 每孔3 ml。每24 h计数3孔, 共计数7 d, 取其均值。

按下列公式计算细胞对数增殖期的Td(h) = (Tlg<sup>2</sup>/lg<sup>N</sup>-lg<sup>NB</sup>)。

#### 1.7 半数抑制量测定(IC<sub>50</sub>) [5]

对数生长期的LoVo和LoVo/5-FU细胞配制成细胞悬液, 0.2 ml/孔接种于96孔培养板中, 使每孔细胞为

10<sup>5</sup>。12 h后加入适量浓度的抗肿瘤药物(每种药物设4种浓度), 对照组加入等量0.01 mol/L PBS(pH7.4), 对照组及各浓度组均设3孔, 继续培养3 d。快速翻转并弃去孔中液体, 在每孔中加入1 μg/ml的MTT 60 μl, 继续培养4 h, 小心吸去孔中上清液(注意不要吸去孔中蓝色结晶), 在每孔中加入二甲基亚砜(DMSO)100 μl, 振荡培养板10 min, 待孔中沉淀完全溶解, 即在Σ960型酶标仪上, 以570 nm为检验波长、630 nm为参考波长测各孔D(λ)值, 抑制率=[1- D(λ)药物/D(λ)对照]×100%。绘制剂量效应曲线, 确定IC<sub>50</sub>。

### 1.8 Bcl-2免疫细胞化学检测

对照组试验分别用空白和PBS代替一抗, 均为阴性。

### 1.9 DNA断裂的检测

应用原位DNA末端转移酶法[6]。细胞生长成片后原位2%多聚甲醛固定15 min, PBS漂洗5 min×3, 甲醛、过氧化氢(0.03%)15 min, PBS漂洗5 min×3, 滴加DNA末端转移酶及FITC标记dUTP反应混合液50 μl, 37 °C湿盒内孵育1 h。PBS漂洗5 min×3, 滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗FITC抗体, 37 °C湿盒内保温1 h, DNA暗处显色5 min, 终止显色, 苏木精复染脱水, 封片, 镜下观察、摄影。阳性细胞的胞浆呈棕黄色, 不着色的为阴性细胞。同时用PBS代替DNA末端转移酶, 作为阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 LoVo/5-FU细胞具有多药耐药性

6个月的诱导培养, LoVo/5-FU细胞在2.5 μg/ml 5-FU、1 μg/ml MMC、1.2 μg/ml ADM和1 μg/ml DDP培养液中均能增殖, 但对MTX, AraC等抗肿瘤药物敏感。

### 2.2 细胞形态学

LoVo/5-FU细胞在诱导培养过程中发现易聚集成团、集落生长、胞体变大。光镜下观察细胞形态无差别。扫描电镜观察, 耐药细胞表面突起多, 有微绒毛出现。

### 2.3 细胞生长曲线测定

图1示LoVo/5-FU和LoVo细胞体外增殖速度略有差异, 两种细胞Td均数分别为26.7 h和31.8 h, 采用两均数比较的t检验进行比较, 差别不显著。

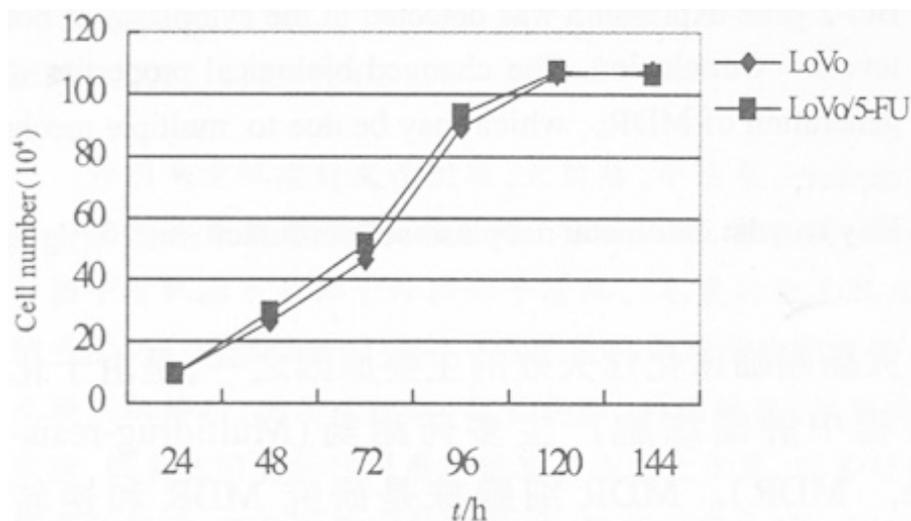


图1 LoVo和LoVo/5-FU细胞株体外增殖曲线

Fig.1 Growth curves of LoVo and LoVo/5-FU cells cultured in vitro

### 2.4 交叉耐药谱

LoVo/5-FU细胞不但对5-FU有耐药性, 而且对结构和作用原理不同的其它抗癌药也有不同程度的耐药性, 但对MTX和AraC等无交叉耐药性(表1)。

表 1 耐药细胞株对 6 种化疗药物的耐药指数

Tab.1 Resistance index of drug-resistant cell lines to anti-tumor drugs

Cells	5-FU	MMC	ADM	DDP	MTX	Arac
LoVo/5-FU	16.48	3.37	2.22	2.70	0.95	0.89

5-Fu: 5-fluorouracil; MMC: Mitomycins; ADM: Adriamycin; DDP: Cisplatin; MTX: Methotrexate; Arac: Cytosine arabinoside

### 2.5 免疫细胞化学

经Bcl-2免疫细胞化学检测，约25%的LoVo/5-FU细胞呈阳性反应，其中2/3的阳性区位于胞膜，1/3位于胞膜和胞浆内，而亲代细胞只有10%呈阳性反应。

### 2.6 凋亡指数(AI)

不同浓度和不同作用时间的5-FU在LoVo和LoVo/5-FU中所诱导的凋亡有明显的依赖关系及时间效应，并且二者AI差异显著(P<0.01，图2、3)。

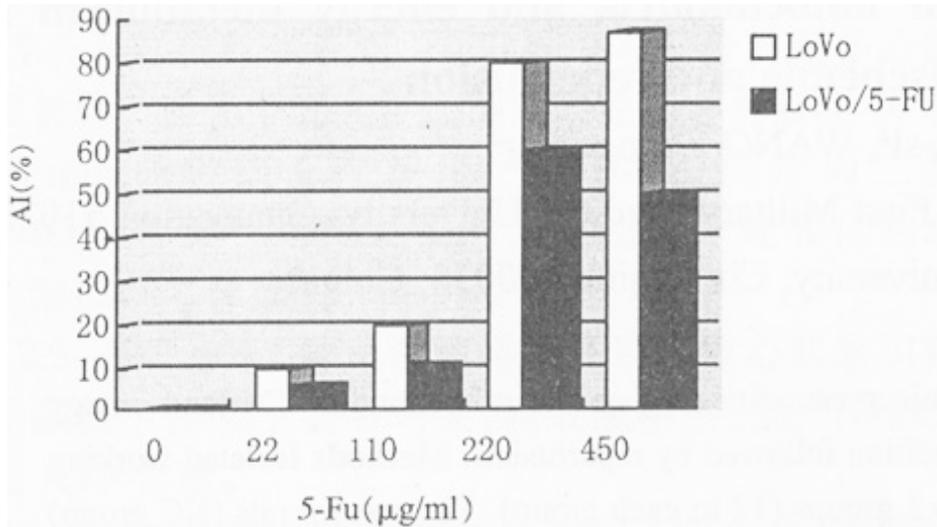
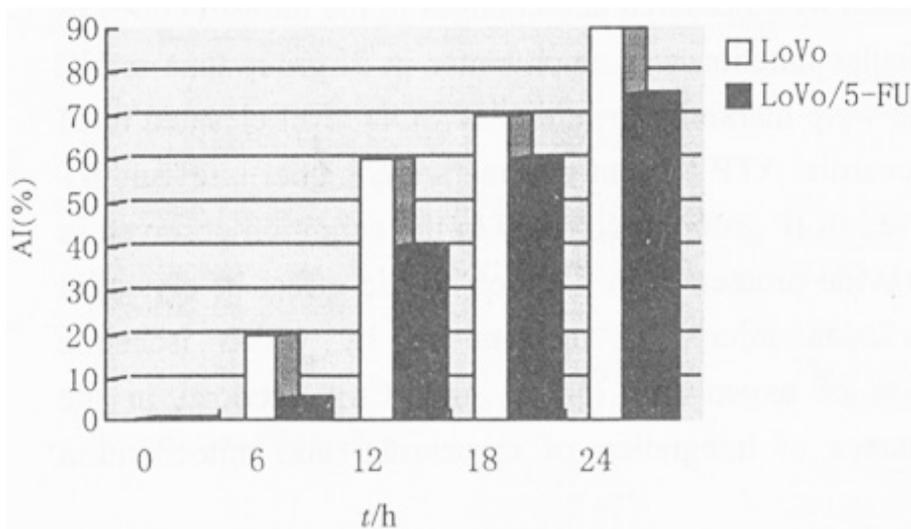


图2 不同浓度5-FU诱导的细胞凋亡指数

Fig.2 Apoptosis index in cells treated with 5-FU of different concentrations



### 3 讨论

大肠癌是消化道常见肿瘤之一，临床就诊时多数患者已处在中晚期，术后5年生存率一直在50%左右。化疗是治疗大肠癌的主要手段之一，但有效率一般小于20%，其根本原因可能是化疗产生的MDR。本研究建立了LoVo/5-FU耐药细胞株，对5-FU的相对耐受度较亲代细胞提高了16.48倍，与亲代细胞相比，耐药细胞生长速度减慢，倍增时间延长，细胞体积增大，胞浆空泡及颗粒增多。肿瘤细胞与抗癌药物接触后，不仅对所用药物产生耐药性，对结构和功能不同的其它药物也产生耐药性，这种交叉耐药性通常与所用诱导药物的耐受程度成正比，而同一细胞接触不同的药物后其耐药谱不同[7]。一般认为，细胞产生耐药的机制是细胞内药物外排增加[8]，并与MDR1基因编码产生的细胞膜P-GP过度表达有关。免疫组化研究表明，约85%的耐药细胞P-GP过度表达，而亲代细胞只有10%。LoVo/5FU细胞和LoVo细胞扫描电镜观察，发现耐药细胞表面出现突起微绒毛。应用原位DNA末端转移酶标记法可将FITI标记的脱氧尿苷三磷酸(dUTP)掺入DNA片段的3'-羟基末端，可以从单个细胞水平检测细胞凋亡。Tunel法既可原位亦可定量检测凋亡细胞，尤其对早期凋亡细胞的检测阳性率高，敏感性好，特异性强。Tunel法标记阳性细胞核黄染，提示DNA断裂，并见核固缩，胞浆不着色。相同条件下5-FU诱导的LoVo及LoVo/5-FU凋亡指数明显低于敏感细胞，提示耐药细胞株LoVo/5-FU细胞凋亡明显受到抑制。

(责任编辑：宋建武)

参考文献：

- [1] Broggini M, Grandi M, Ubezio P, et al. Intracellular doxorubicin concentrations and drug-induced DNA damage in a human colon adenocarcinoma cell line and in a drug-resistant subline[J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(23):4423-31.
- [2] Sommers CL, Walker JD, Heckford SE, et al. Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(15):4258-63.
- [3] 栾凤君. 一株人红白血病多药耐药细胞系(K562/A02)的建立及其耐药特性的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1993, 15(2):101-3.
- [4] 蔡学君, 张学庸, 樊代明. 胃癌耐药细胞株耐药谱的体外实验[J]. *第四军医大学学报*, 1994, 15(2):86-8.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 136-54.
- [6] 夏雪峰, 冉丕鑫, 何旦沙. 原位凋亡细胞末端标记测定[J]. *中国现代医学杂志*, 1997, 7(11):30-6.
- [7] Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, et al. Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using the MTT assay[J]. *Br J Cancer*, 1992, 66(5):749-7.
- [8] Yang LY, Trujillo JM. Biological characterization of multidrug resistant human colon carcinoma sublines including two methods [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(6):3218-25.

参考文献：

- [1] Broggini M, Grandi M, Ubezio P, et al. Intracellular doxorubicin concentrations

and drug-induced DNA damage in a human colon adenocarcinoma cell line and in a drug-resistant subline[J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(23):4423-31.

[2] Sommers CL, Walker JD, Heckford SE, et al. Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(15):4258-63.

[3] 栾凤君. 一株人红白血病多药耐药细胞系(K562/A02)的建立及其耐药特性的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1993, 15(2):101-3.

[4] 蔡学君, 张学庸, 樊代明. 胃癌耐药细胞株耐药谱的体外实验[J]. *第四军医大学学报*, 1994, 15(2):86-8.

[5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 136-54.

[6] 夏雪峰, 冉丕鑫, 何旦沙. 原位凋亡细胞末端标记测定[J]. *中国现代医学杂志*, 1997, 7(11):30-6.

[7] Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, et al. Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using the MTT assay[J]. *Br J Cancer*, 1992, 66(5):749-7.

[8] Yang LY, Trujillo JM. Biological characterization of multidrug resistant human colon carcinoma sublines including two methods [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(6):3218-25.

---

## [回结果列表](#)