



胞苷raC袁上海第十二制药厂窠配成 100伊保存液袁原0 益分装保存日噻唑蓝渊MTT袁igma 公司窠原位 DNA 末端转移酶标记试剂盒 渊德国宝灵曼公司窠LSAB 试剂盒购自北京中山生物技术公司遥

### 1.3 RPMI-1640 培养液

该培养液为美国 GIBCO 公司产品遥10.4g 粉剂加三蒸水至 1 000ml 袁内含 NaHCO<sub>3</sub> 2.0g, HEPES 2.7g, 青霉素尧链霉素各 100U/ml 遥0.22 滋n 微孔滤膜过滤除菌袁 益保存袁使用前加入灭活新生小牛血清袁其浓度为 15% 遥

### 1.4 诱导培养方法

LoVo 细胞在含有 15% 灭活新生小牛血清渊州四季青公司 窠酌 1640 培养液中袁于 37 益尧% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱中无菌培养遥当细胞处于对数生长期时袁置 2.5 滋/ml 5-FU 中作用 1 h 袁640 培养液冲洗 2 次遥1 个月后渊细胞处于对数生长期时 需次用 2.5 滋/ml 5-FU 处理和 1640 培养液冲洗袁如此反复诱导袁历时约 6 个月袁至 LoVo 细胞可以长期在 2.5 滋/ml 5-FU 培养液中生长遥

### 1.5 一般形态学观察

使 LoVo 和 LoVo/5-FU 细胞在载玻片上生长袁常规 HE 染色袁镜下观察并摄片遥

### 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窠配制成 10<sup>5</sup> /ml 细胞悬液袁接种于 6 孔培养板中袁每孔 3ml 遥每 24 h 计数 3 孔袁共计数 7 d 袁取其均值遥

按下列公式计算细胞对数增殖期的 Td(h)=  $\frac{1}{lg^2/1g^N - 1g^{NB}}$  窠

### 1.7 半数抑制量测定 C<sub>50</sub> 窠

对数生长期的 LoVo 和 LoVo/5-FU 细胞配制成细胞悬液袁2ml/ 孔接种于 96 孔培养板中袁使每孔细胞为 10<sup>5</sup> 遥2 h 后加入适量浓度的抗肿瘤药物渊每种药物设 4 种浓度 窠袁对照组加入等量 0.01mol/L PBS 渊H7.4 窠袁对照组及各浓度组均设 3 孔袁继续培养 3 d 遥快速翻转并弃去孔中液体袁在每孔中加入 1 滋/ml 的 MTT 60 滋袁继续培养 4 h 袁小心吸去孔中上清液渊注意不要吸去孔中蓝色结晶 窠袁在每孔中加入二甲基亚砷渊MSO 窠00 滋袁振荡培养板 10 min 袁待孔中沉淀完全溶解袁在撞 60 型酶标仪上袁以 570nm 为检验波长尧30nm 为参考波长测各孔 D<sub>opt</sub> 渊抑制率 = 咱原D<sub>opt</sub> 窠药物 / D<sub>opt</sub> 窠对照 伊 100% 遥绘制剂量效应曲线袁确定 IC<sub>50</sub> 遥

### 1.8 Bcl-2 免疫细胞化学检测

对照组试验分别用空白和 PBS 代替一抗袁均为阴性遥

### 1.9 DNA 断裂的检测

应用原位 DNA 末端转移酶法 窠遥细胞生长成片后原位 2% 多聚甲醛固定 15 min 袁BS 漂洗 5 min 伊袁加 DNA 末端转移酶及 FITC 标记 dUTP 反应混合液 50 滋袁7 益湿盒内孵育 1 h 遥PBS 漂洗 5 min 伊袁滴加辣根过氧化物酶渊RP 窠标记的抗 FITC 抗体袁7 益湿盒内保温 1 h 袁DNA 暗处显色 5 min 袁终止显色袁苏木精复染脱水袁封片袁镜下观察尧摄影遥阳性细胞的胞浆呈棕黄色袁不着色的为阴性细胞遥同时用 PBS 代替 DNA 末端转移酶袁作为阴性对照遥

## 2 结果

### 2.1 LoVo/5-FU 细胞具有多药耐药性

6 个月的诱导培养袁oVo/5-FU 细胞在 2.5 滋/ml 5-FU 尧 滋/ml MMC 尧 2 滋/ml ADM 和 1 滋/ml DDP 培养液中均能增殖袁但对 MTX 袁raC 等抗肿瘤药物敏感遥

### 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尧集落生长尧胞体变大 遥镜下观察细胞形态无差别 遥扫描电镜观察袁耐药细胞表面突起多袁有微绒毛出现遥

### 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袁两种细胞 Td 均数分别为 26.7h 和 31.8h 袁采用两均数比较的 窠检验进行比较袁差别不显著遥

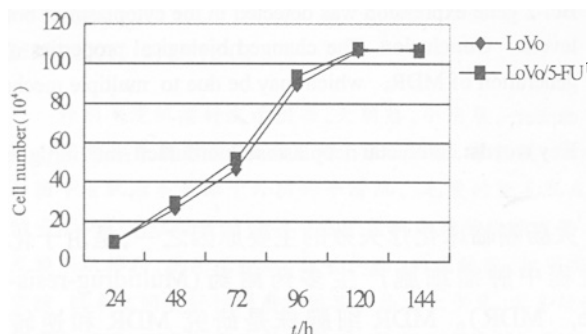


图 1 窠和 窠细胞株体外增殖曲线 窠

### 2.4 交叉耐药谱

LoVo/5-FU 细胞不但对 5-FU 有耐药性袁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

耐药性袁但对 MTX 和 Arac 等无交叉耐药性袁

表 1 耐药细胞株对 6 种化疗药物的耐药指数  
袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌

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 院-fluorouracil;MMC 院mitomycins;ADM 院adriamycin;  
DDP 院isplatin;MTX 院methotrexate; Arac:Cytosinearabioside

### 2.5 免疫细胞化学

经 Bcl-2 免疫细胞化学检测袁约 25% 的 LoVo/5-FU 细胞呈阳性反应袁其中 2/3 的阳性区位于胞膜袁 1/3 位于胞膜和胞浆内袁而亲代细胞只有 10% 呈阳性反应遥

### 2.6 凋亡指数袁

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袁且二者 AI 差异显著袁 $P < 0.01$ 袁

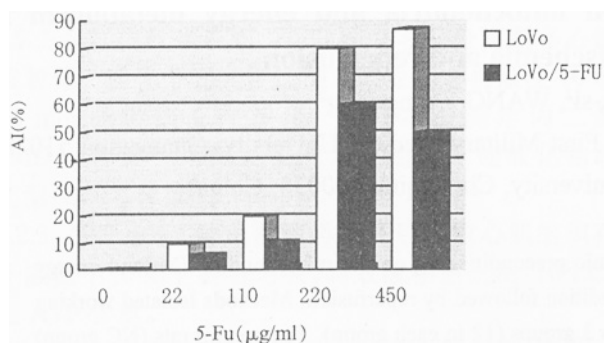


图 2 不同浓度 5-FU 诱导的细胞凋亡指数

袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌

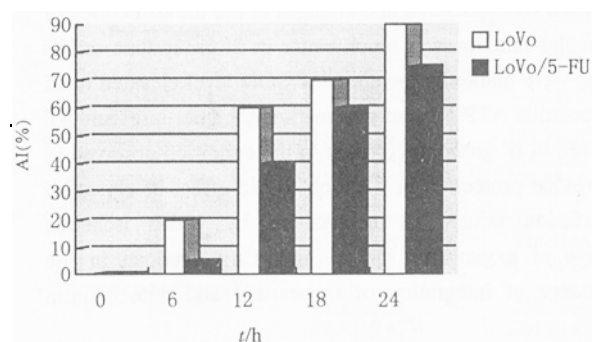


图 3 110 μg/ml 5-FU 诱导的凋亡指数

袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌 袁建斌

### 3 讨论

大肠癌是消化道常见肿瘤之一袁临床就诊时多数患者已处在中晚期袁术后 5 年生存率一直在 50% 左右遥化疗是治疗大肠癌的主要手段之一袁但有效率一

般小于 20% 袁其根本原因可能是化疗产生的 MDR 遥本研究建立了 LoVo/5-FU 耐药细胞株袁对 5-FU 的相对耐受度较亲代细胞提高了 16.48 倍袁与亲代细胞相比袁耐药细胞生长速度减慢袁倍增时间延长袁细胞体积增大袁胞浆空泡及颗粒增多遥肿瘤细胞与抗癌药物接触后袁不仅对所用药物产生耐药性袁对结构和功能不同的其它药物也产生耐药性袁这种交叉耐药性通常与所用诱导药物的耐受程度呈正比袁而同一细胞接触不同的药物后其耐药谱不同遥一般认为袁细胞产生耐药的机制是细胞内药物外排增加袁与 P-糖蛋白基因编码产生的细胞膜 P-GP 过度表达有关遥免疫组化研究表明袁约 85% 的耐药细胞 P-GP 过度表达袁而亲代细胞只有 10% 遥 LoVo/5FU 细胞和 LoVo 细胞扫描电镜观察袁发现耐药细胞表面出现突起微绒毛遥应用原位 DNA 末端转移酶标记法可将 FITI 标记的脱氧尿苷三磷酸 UTP 掺入 DNA 片段的 3'-羟基末端袁可以从单个细胞水平检测细胞凋亡遥 TUNEL 法既可原位亦可定量检测凋亡细胞袁其对早期凋亡细胞的检测阳性率高袁敏感性好袁特异性强遥 TUNEL 法标记阳性细胞核黄染提示 DNA 断裂袁并见核固缩袁胞浆不着色遥相同条件下 5-FU 诱导的 LoVo 及 LoVo/5-FU 凋亡指数明显低于敏感细胞袁提示耐药细胞株 LoVo/5-FU 细胞凋亡明显受到抑制遥

### 参考文献院

袁建斌 Brogginim, Grandi M, Ubezi P. Intracellular doxorubicin concentrations and drug-induced DNA damage in a human colon adenocarcinoma cell line and in a drug-resistant subline. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(23): 4423-31.

袁建斌 Sommers CL, Walker JD, Heckford SE. Keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 1989, 49(15): 4258-63.

袁建斌 梁凤君. 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. *中华肿瘤杂志*, 1993, 15(2): 101-3.

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

袁建斌 司徒镇强, 秦军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 136-54.

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

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

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