

人肝癌 BEL-7402/ 5-FU 多药耐药细胞株的建立及其生物学特性观察

顾伟, 张亚妮, 李柏, 韩洁, 程彬彬, 凌昌全
(第二军医大学长海医院中医科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 建立人肝癌 BEL-7402/ 5-FU 多药耐药细胞株。方法: 采用体外低浓度梯度递增联合大剂量间断冲击的诱导方法建立 5-FU 获得性 BEL-7402/ 5-FU 多药耐药细胞株。MTT 法检测耐药细胞株对多种化疗药物的交叉耐药性。观察其细胞形态学、生长曲线、倍增时间、平板克隆形成率、贴壁率、细胞周期分布、染色体核型以及裸鼠致瘤性。流式细胞术检测阿霉素在亲本及耐药细胞株内的积聚量。免疫细胞化学法检测胸苷酸合酶在耐药细胞内的表达。结果: 成功建立人肝癌 BEL-7402/ 5-FU 多药耐药细胞株模型。该耐药细胞对阿霉素、长春新碱、奥沙利铂及甲氨蝶呤均有不同程度的交叉耐药性, 但对羟基喜树碱仍较敏感。体外培养见细胞趋向群集性生长。耐药细胞株倍增时间较亲本细胞株长, 克隆形成率则较亲本细胞株低, 差异有统计学意义。耐药细胞贴壁率在 2、3 h 明显低于亲本细胞株, 其 G₀/ G₁ 期细胞分布比率较低而 S 期比率明显增加。阿霉素在耐药细胞株内的积聚量低于亲本细胞株, 耐药细胞株胸苷酸合酶的蛋白表达量较亲本细胞株明显增强。结论: 人肝癌 BEL-7402/ 5-FU 多药耐药细胞株可以成为研究 5-FU 获得性耐药机制及开展多药耐药逆转剂筛选较好的体外模型。

[关键词] 肝细胞癌; 多药耐药; 5-氟尿嘧啶; 细胞系

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2006)03-0265-06

Establishment of a multidrug-resistant cell line BEL-7402/ 5-FU of human hepatocellular carcinoma and its biological characteristics

Wei GU, Ya-Ni ZHANG, Bai LI, Jie HAN, Bin-Bin CHENG, Chang-Quan LING

(Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To establish a multidrug-resistant cell line BEL-7402/ 5-FU of hepatocellular carcinoma (HCC). Methods: BEL-7402/ 5-FU was induced by pulse therapy combined with continuous stepwise exposure to 5-fluorouracil in vitro. MTT assay was used to determine its multidrug resistance (MDR). Biological characteristics of the BEL-7402/ 5-FU cell line were observed including morphological changes, cell growth curve, population doubling time, plate cloning efficiency, adherence rate, cell cycle distribution, chromosome and tumorigenicity. Accumulation amount of adriamycin (ADM) in cytoplasm was measured by flow cytometry. The protein expression of thymidylate synthase (TS) was evaluated by immuno-cytochemical method. Results: The acquired MDR cell line of BEL-7402/ 5-FU was established successfully. The BEL-7402/ 5-FU cells showed cross-resistance to ADM, vincristine (VCR), methotrexate (MTX) and oxaliplatin (OHP), whereas still sensitive to hydroxycamptothecin (HCPT). The BEL-7402/ 5-FU cells tended to grow in clusters in vitro. It was found that the population doubling time of BEL-7402/ 5-FU cells was longer than that of its parental cells. The plate cloning efficiency and the adherence rate of BEL-7402/ 5-FU cells at the 2nd and 3rd hour were both lower than those of the parental cells. The distributing proportion of BEL-7402/ 5-FU cells in G₀/ G₁ phase was less than that of the parental cells, whereas the distributing proportion of BEL-7402/ 5-FU

[基金项目] 上海市科学技术委员会基金资助项目 (No. 05ZR14144)

Correspondence to: Chang-Quan LING, MD, Professor. E-mail: Lingchangquan@hotmail.com

cells in S phase was higher than that of the parental cells. The accumulation amount of ADM in cytoplasm of BEL-7402/ 5-FU cells was significantly lower while the expression level of TS protein of which was highly up-regulated as compared with those of the parental cells. Conclusion: Establishment of the human HCC cell line BEL-7402/ 5-FU might be beneficial to the studies of 5-Fluorouracil acquired MDR mechanisms and the selection of reversal modifiers.

KEY WORDS hepatocellular carcinoma; multidrug resistance; 5-fluorouracil; cell line

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao/ J Chin Integr Med, 2006, 4(3): 265-270 www.jcimjournal.com

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是治疗肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的一线化疗药物,然而肝细胞癌获得性多药耐药(multidrug resistance, MDR)的产生会极大地影响HCC患者对5-FU治疗的敏感性,从而限制了其临床疗效。建立MDR模型是研究肝细胞癌获得性MDR产生的机制以及筛选逆转剂的重要方法。我们采用体外低浓度梯度递增联合大剂量间断冲击诱导方法建立人肝癌BEL-7402/5-FU耐药细胞株,并对其生物学特性进行了初步研究,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养 人肝癌BEL-7402细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所,在含10%小牛血清的RPMI-1640完全培养基、37℃、体积分数为5% CO₂及饱和湿度条件下进行常规培养,采用EDTA与胰蛋白酶按1:2的体积比消化细胞。

1.2 药物及试剂 蟾毒灵(bufalin)、碘化丙锭为美国Sigma公司产品;5-FU为上海旭东海普药业有限公司产品;长春新碱(vincristine, VCR)为浙江海正药业股份有限公司产品;阿霉素(adriamycin, ADM)为深圳万乐药业有限公司产品;甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)为上海华联制药有限公司产品;奥沙利铂(oxaliplatin, OHP)为法国Sanofi公司产品;羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)为湖北黄石飞云制药有限公司产品;四唑氮蓝为美国Amresco公司产品;RPMI-1640培养基为美国Gibco公司产品;小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品;胸苷酸合酶(thymidylate synthase, TS)即用型免疫组化试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品;Ref.42 505支原体检测试剂盒为法国BioMerieux公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 人肝癌BEL-7402/5-FU耐药细胞株的建立

采用体外低浓度梯度递增联合大剂量间断冲击诱导方法建立人肝癌BEL-7402/5-FU耐药细胞株。BEL-7402细胞生长进入指数生长期时,常规消化细

胞,按 2×10^6 个/瓶,移入25 cm²塑料培养瓶,加入含0.1 μmol/L 5-FU的培养液,低浓度持续诱导3~5 d,弃去上清及死亡后悬浮的细胞,加入新鲜培养液脱药培养,当细胞恢复生长并覆盖达到2/3瓶壁时,加入含10 μmol/L 5-FU的培养液进行大剂量冲击诱导,待存活细胞恢复增殖后,加入含1 μmol/L 5-FU的培养液继续诱导,直至细胞能在该浓度下增殖,将此细胞命名为BEL-7402/5-FU₍₁₎细胞株。根据以上方法反复诱导,当细胞能在含50 μmol/L 5-FU的培养液中存活时,即为人肝癌BEL-7402/5-FU耐药细胞株。取脱药培养3代并处于指数生长期的细胞用于研究。

1.3.2 MTT法测定人肝癌BEL-7402/5-FU耐药细胞株的多药耐药性 采用MTT法^[1]分别检测人肝癌BEL-7402亲本及耐药细胞株对5-FU、ADM、VCR、MTX、OHP和HCPT等化疗药物的敏感性。采用中效分析软件(Logit法)计算各药物对亲本及耐药细胞的半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀),按以下公式计算耐药指数^[2](resistance index, RI)。RI = IC₅₀耐药细胞 / IC₅₀亲本细胞。

1.3.3 细胞形态学观察 在倒置显微镜下对体外培养细胞进行观察。

1.3.4 细胞生长曲线及群体倍增时间的检测 采用MTT法分别检测0、24、48、72、96、120、144、168、192和216 h共10个时间点的光密度(optical density, OD)值,每个时间点设12个复孔。以时间为横轴,OD值均数为纵轴,绘制细胞生长曲线。细胞群体倍增时间参照文献方法^[3]计算。

1.3.5 细胞贴壁率与平板克隆形成率的检测 收集细胞、制备单细胞悬液。台盼蓝染色进行活细胞计数,按 1×10^6 个/瓶分别接种于6个1次性塑料培养瓶内。每1 h取1个培养瓶的细胞,吸弃未贴壁的细胞,消化贴壁细胞,进行细胞计数。根据以下公式计算细胞贴壁率:细胞贴壁率 = (贴壁细胞数 / 接种细胞数) × 100%。细胞平板克隆形成率参考文献实验方法^[4]。

1.3.6 细胞内药物积聚的分析 调整细胞浓度为

1 × 10⁵ 个/ml, 按 2 ml 孔分别接种于六孔板内, 常规培养 36 h 后, 加入终浓度为 20 μg/ml 的 ADM, 孵育 2 h 后收集细胞 (4 × 10⁵ 个/ml), 用冷 PBS 液 (4 ℃, 0.01 mol/L, pH 7.4) 洗涤、离心 2 次, PBS 重悬, 立即上流式细胞仪进行检测 (激发波长 488 nm, 接收波长 575 nm), 采用 CellQuest 软件分析门控内细胞 ADM 荧光强度。

1.3.7 细胞周期分析 BEL-7402 亲本及耐药细胞在六孔板内常规培养 36 h 后, 消化、收集细胞入流式细胞管中, 冷 PBS 液洗涤 2 次, 70% 乙醇重悬, 4 ℃ 过夜。次日, 用 PBS 液洗涤 2 次后, 加入 PBS 稀释的 400 μl 碘化丙锭染料 (50 μg/ml) 及 10 μl RNA 酶 (1 000 μg/ml), 避光染色 30 min, 上流式细胞仪分析 DNA 含量, 细胞取样量为 20 000 个/标本。采用 Modfit LT for Mac V3.0 软件进行细胞周期分析。

1.3.8 免疫细胞化学检查 分别收集 BEL-7402 亲本及耐药细胞, 制作细胞爬片。采用 Envision™ 二步法行 TS 蛋白免疫组化实验, 胞浆呈棕黄色为阳性细胞。采用 IMS 计算机细胞图像分析系统进行阳性表达强度的定量分析。光镜下 (×100) 随机选取 6 个视野, 通过预设采样程序得出阳性面积百分比和 OD 值, 两者的乘积为免疫组化阳性指数。

1.3.9 染色体核型分析 参照文献方法^[5]。

1.3.10 裸鼠致瘤实验 收集细胞制备单细胞悬液, 用生理盐水调整细胞浓度为 2.5 × 10⁷/ml, 按 0.2 ml 接种点分别接种于裸鼠左腋窝及右后肢背部沟的皮下, 观察皮下肿瘤的生长情况。

1.3.11 微生物污染鉴定 定期取细胞进行细菌及真菌培养, 按 BioMerieux 公司提供的 Ref. 42 505 支原体检测试剂盒说明书流程进行细胞支原体培养和鉴定。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 计量资料均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 人肝癌 BEL-7402/5-FU 细胞株耐药性的诱导

采用体外低浓度梯度递增联合大剂量间断冲击诱导方法建立人肝癌 BEL-7402/5-FU 耐药细胞株, 整个过程历时 10 个月。细胞株经冻存后复苏, 耐药指数有所下降, 体外连续脱药培养 1 个月后, 平均耐药指数为 16.55 ± 3.79, 下降幅度 < 25%; 经过 10 ~ 30 μmol/L 5-FU 短暂诱导后, 耐药指数可恢复至细胞冻存前的水平。见图 1。

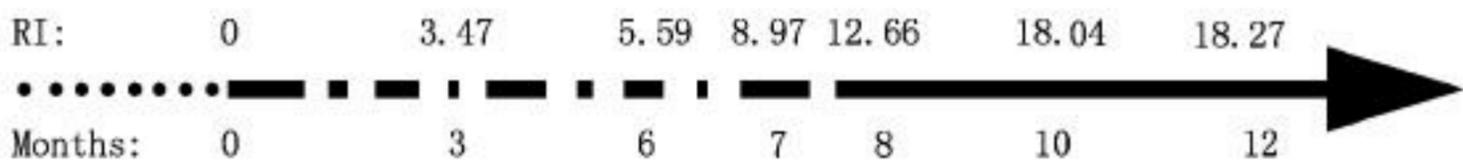


图 1 人肝癌 BEL-7402/5-FU 细胞株耐药性的诱导

Figure 1 Induction of acquired resistance of human HCC BEL-7402/5-FU cells

2.2 多药耐药性的检测 BEL-7402/5-FU 不仅对抗代谢类药物 5-FU 和 MTX 产生耐药性, 对天然来源的抗肿瘤药物 ADM、VCR 和 OHP 也可产生不同程度的耐药性, 但对 HCPT 较为敏感。对 5-FU、ADM、VCR、OHP、MTX 和 HCPT 的 RI 分别为 18.04、2.12、9.83、5.60、8.17 和 1.04。见表 1。

2.3 生长曲线与群体倍增时间 细胞接种 96 h

后, BEL-7402/5-FU 耐药细胞株与 BEL-7402 亲本细胞株 OD 值比较, 有统计学差异; 144 h 后, BEL-7402/5-FU 耐药细胞株的 OD 值明显高于 BEL-7402/5-FU₍₁₎ 耐药细胞株, 差异有统计学意义。BEL-7402/5-FU 耐药细胞株的细胞群体倍增时间为 (42.26 ± 3.31) h, 明显长于 BEL-7402 亲本细胞株的 (31.15 ± 1.14) h, 差异有统计学意义。见图 2。

表 1 BEL-7402 亲本和 BEL-7402/5-FU 耐药细胞株对不同抗肿瘤药物的耐药活性

Table 1 Drug resistance of human HCC BEL-7402 and BEL-7402/5-FU cells to different anti-tumor drugs

($\bar{x} \pm s$, μmol/L)

Cell line	n	IC50 (48 h)					
		5-FU	ADM	VCR	OHP	MTX	HCPT
BEL-7402	3	23.70 ± 9.35	1.30 ± 0.31	0.89 ± 0.27	43.21 ± 12.30	60.87 ± 29.35	10.09 ± 1.35
BEL-7402/5-FU	3	427.60 ± 110.50	2.75 ± 0.58	8.83 ± 2.54	7.72 ± 3.65	497.25 ± 100.41	10.52 ± 2.62

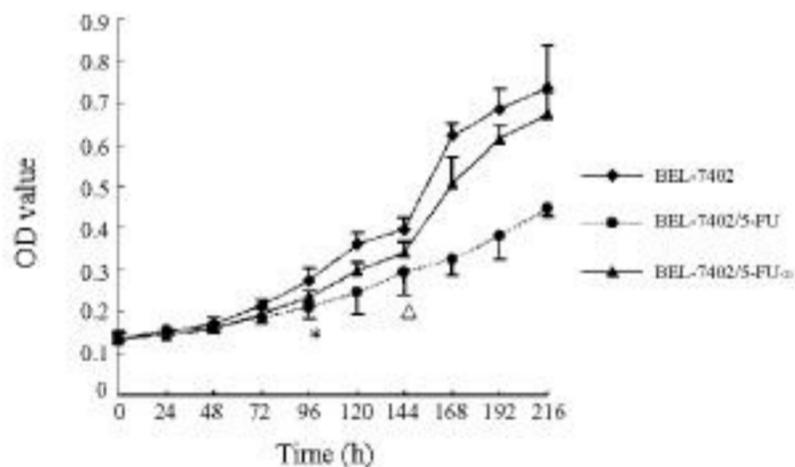


图 2 人肝癌 BEL-7402/5-FU 细胞株生长曲线

Figure 2 Growth curve of human HCC BEL-7402/5-FU cells

* $P < 0.05$, BEL-7402/5-FU vs BEL-7402; $P < 0.05$, BEL-7402/5-FU vs BEL-7402/5-FU₍₁₎; $n = 12$, $\bar{x} \pm s$.

2.4 平板克隆形成率和细胞贴壁率 BEL-7402/

5-FU 耐药细胞株平板克隆形成率为 $(53.00 \pm 5.85)\%$, 与亲本细胞的 $(69.08 \pm 8.06)\%$ 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。亲本及耐药细胞株贴壁率随着接种时间的延长逐渐提高, BEL-7402/5-FU 细胞株与亲本细胞株在接种培养瓶中 2 h 和 4 h 的贴壁率比较具有统计学差异。见表 2。

2.5 细胞形态学观察 在倒置显微镜下观察, 与亲本细胞相比, BEL-7402/5-FU 耐药细胞株常呈分片样、群集性生长, 细胞棱角减少, 呈梭形样改变, 胞浆清亮、折光性增强, 细胞传代时的消化时间明显缩短, 不易吹打成单细胞悬液。

2.6 细胞周期分析 BEL-7402/5-FU 耐药细胞株 G₀/G₁ 期细胞分布比率低于亲本细胞株; 耐药细胞株 S 期和 G₂/M 期细胞分布比率明显高于亲本细胞株。见表 3、图 3。

表 2 人肝癌 BEL-7402 亲本和 BEL-7402/5-FU 耐药细胞株贴瓶率的比较

Table 2 Comparison of adherence rate between human HCC BEL-7402 and BEL-7402/5-FU cells

($\bar{x} \pm s, \%$)

Cell line	n	Adherence rate (%)						
		0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
BEL-7402	4	0	43.25 ± 5.31	86.75 ± 4.34	92.75 ± 11.87	93.75 ± 11.32	95.75 ± 11.61	95.75 ± 11.61
BEL-7402/5-FU	4	0	35.00 ± 4.96	61.50 ± 2.88*	75.75 ± 6.70*	85.25 ± 8.18	88.50 ± 16.29	91.00 ± 7.78

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs BEL-7402.

表 3 人肝癌 BEL-7402 亲本和 BEL-7402/5-FU 耐药细胞株细胞周期分布的比较

Table 3 Comparison of cell cycle distribution between human HCC BEL-7402 and BEL-7402/5-FU cells

($\bar{x} \pm s, \%$)

Cell line	n	Cell cycle (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
BEL-7402	3	61.38 ± 2.85	25.54 ± 1.17	13.07 ± 1.69
BEL-7402/5-FU	3	48.30 ± 1.00**	31.73 ± 0.12*	19.95 ± 1.05**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs BEL-7402.

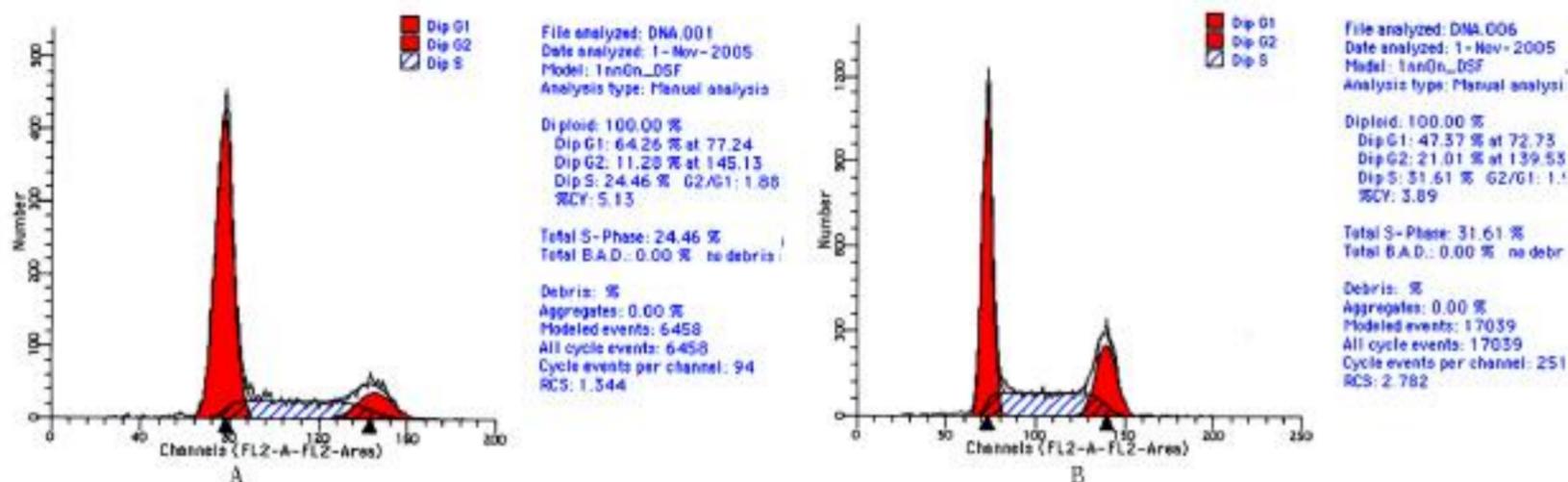


图 3 人肝癌 BEL-7402 亲本和 BEL-7402/5-FU 耐药细胞株细胞周期的分布

Figure 3 Cell cycle distribution of human HCC BEL-7402 and BEL-7402/5-FU cells

A: BEL-7402; B: BEL-7402/5-FU.

2.7 细胞内药物积聚的分析 BEL-7402/ 5-FU 耐药细胞内 ADM 的荧光强度要明显低于亲本细胞株,差异有统计学意义。见图 4。

2.8 免疫细胞化学结果 BEL-7402/ 5-FU 耐药细胞株胞浆 TS 蛋白表达呈强阳性,免疫细胞化学阳性指数与亲本细胞株比较差异有统计学意义。见表 4、图 5。

2.9 染色体核型分析 耐药细胞株与亲本细胞株均为非整倍体染色体,染色体众数分布在 54 ~ 58(条)之间。G 显带分析提示两种细胞株染色体在数目和形态上无明显差异,但耐药细胞株细胞分裂指数明显低于亲本细胞株。见图 6。

2.10 致瘤实验 BEL-7402 亲本及耐药细胞均能在裸鼠皮下成瘤,耐药细胞株成瘤潜伏期(35 ~ 50 d)较亲本细胞株(15 ~ 20 d)明显延长。两者均

呈结节分叶样生长,肿瘤周围血供丰富,病理切片观察未发现细胞形态学改变。

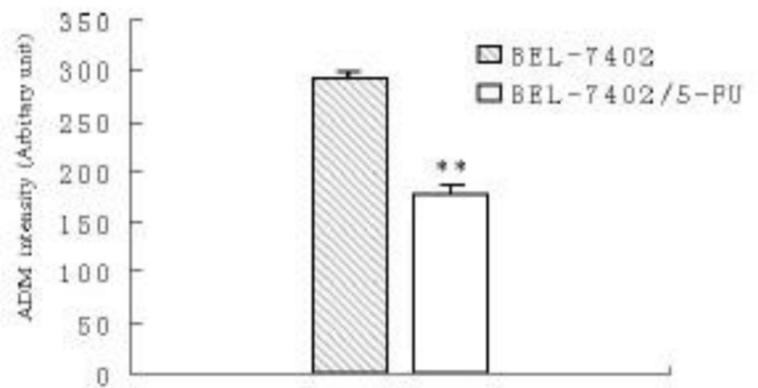


图 4 人肝癌 BEL-7402 亲本和 BEL-7402/ 5-FU 耐药细胞株内阿霉素的积聚量

Figure 4 Accumulation of adriamycin in human HCC BEL-7402 and BEL-7402/ 5-FU cells

** $P < 0.01$, vs BEL-7402.

表 4 人肝癌 BEL-7402 亲本和 BEL-7402/ 5-FU 耐药细胞株 TS 表达的比较

Table 4 Comparison of TS expression between human HCC BEL-7402 and BEL-7402/ 5-FU cell lines

($\bar{x} \pm s$)

Cell line	n	Positive-area percentage (%)	OD value	Positive index
BEL-7402	3	7.75 ± 2.18	14.50 ± 1.05	1.14 ± 0.39
BEL-7402/ 5-FU	3	18.23 ± 2.32	18.67 ± 0.52	3.41 ± 0.47**

** $P < 0.01$, vs BEL-7402.

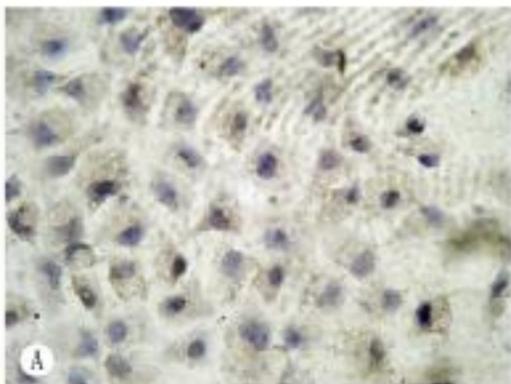


图 5 人肝癌 BEL-7402 亲本和 BEL-7402/ 5-FU 耐药细胞株的 TS 表达(Envision 染色, × 400)

Figure 5 TS expression in human HCC BEL-7402 and BEL-7402/ 5-FU cells (Envision staining, × 400)

A: Low expression of TS in BEL-7402 cells; B: High expression of TS in BEL-7402/ 5-FU cells.

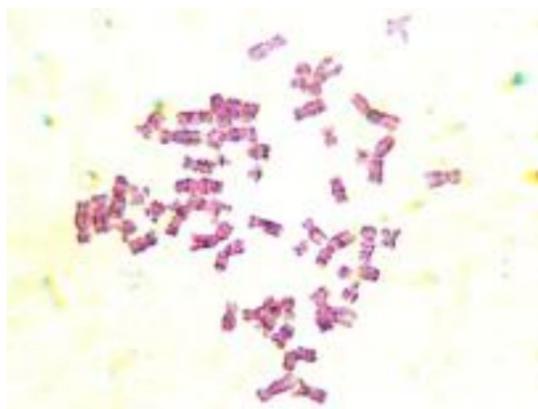


图 6 BEL-7402/ 5-FU 细胞株染色体(Giemsa 染色, × 4 000)

Figure 6 Chromosome of BEL-7402/ 5-FU cells

(Giemsa staining, × 4 000)

2.11 微生物污染鉴定 定期进行 BEL-7402/ 5-FU 耐药细胞株细菌及真菌培养实验,均未发现污

染;在支原体检测试剂盒内培养 48 h 后,试剂条(R3)3 个反应杯培养基均呈现黄色反应,未发现支原体污染。

3 讨论

肿瘤细胞 MDR 的产生是肿瘤化学治疗失败的重要原因,建立 MDR 细胞株是探求 MDR 产生机制及进行逆转耐药研究的重要途径。目前肿瘤 MDR 细胞株建立的方法主要有基因转染法^[6]和药物筛选法^[7],前者所建立的耐药细胞株其耐药机制较为单一,适用于药物靶点的筛选研究;后者即大剂量药物冲击疗法联合浓度梯度递增法,是进行体外药物筛选肿瘤细胞 MDR 模型的常用方法。两种方法各有其优缺点,前者所需的诱导时间长,而后者的

药物剂量不易控制。究竟哪种模型更能准确反映临床耐药的形成过程,目前学者们对此尚无一致认识。我们采用体外低浓度梯度递增联合大剂量间断冲击的方法,用 10 个月的时间成功诱导并建立了人肝癌 BEL-7402/5-FU 耐药细胞株。MTT 药敏检测表明,该细胞株不仅对 5-FU 产生了较高的耐药性,对 MTX、ADM、VCR 及 OHP 亦有不同程度的耐药性。耐药表型稳定性研究表明,该细胞株经冻存后复苏并连续脱药培养 1 个月后,虽然其耐药性略有下降,但是经过短暂的低浓度药物诱导,耐药性仍能恢复至冻存之前的水平,这些特性与文献报道一致^[8]。

自 1970 年 Bielder 和 Riehm 发现 MDR 以来,已有多种与耐药相关的生化机制被阐述明,包括:药物外排增加;解毒系统的活化;药物作用靶点的改变;凋亡通路受阻;DNA 损伤性修复增强等。不同化疗药物所诱导的 MDR 机制不尽相同,如肿瘤细胞对天然疏水性抗肿瘤药物如长春新碱、蒽环类、鬼臼类等药物产生的 MDR,主要是由 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)型膜载体蛋白家族所介导^[9]。5-FU 及其衍生物在原发性肝癌的化学治疗中占有重要地位,然而关于 5-FU 等抗代谢类抗肿瘤药物诱导建立 MDR 细胞株的研究,国内外报道较少。建立耐 5-FU 为主的肝癌 MDR 细胞株对开展肝癌 MDR 的逆转研究及提高临床化疗的疗效具有重要的现实意义。

5-FU 主要通过其活性代谢产物 5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷酸以抑制 TS 的活性,从而抑制 DNA 合成而发挥抗肿瘤作用。TS 蛋白的表达增强与 5-FU 获得性耐药的产生关系密切^[10]。本实验结果表明, BEL-7402/5-FU 耐药细胞株的 TS 蛋白表达水平明显高于亲本细胞株。流式细胞术检测结果发现,耐药细胞内 ADM 的积聚量明显低于亲本细胞,提示耐药细胞株可能存在某种或几种 ABC 型膜载体蛋白以降低化疗药物在细胞内的浓度,逃避药物的细胞毒作用继而产生 MDR。同时,耐药细胞株倍增时间延长、克隆形成率降低、G₀/G₁ 期细胞减少而 S 期细胞增多,分析其倍增时间的变化与细胞周期及其在细胞周期不同阶段的停滞时间相关,细胞周期进程的延缓可导致细胞逃避周期特性化疗药物的细胞毒损伤,产生耐药性^[11]。由此推测, BEL-7402/5-FU 多药耐药细胞株细胞周期动力学的改变可能与其耐药表型的获得相关。此外,有研究发现多种肿瘤细胞株在三维立体培养时对化疗药物的敏感性均显著低于同一细胞株的二维单层培养^[12],推测细胞同质性黏附能力的增强可导致肿瘤细胞产生黏附介导的耐药^[13]。本实验建立的由 5-FU 诱导的 BEL-7402 多药耐药细胞株,在体外培养时常呈群集性生长,细胞消化时不易被吹

打成单个细胞,这种同质性黏附能力的增强是否与 MDR 的产生有关,尚待进一步研究。

[参考文献]

- 1 Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 1986, 89(2): 271-277.
- 2 Chou TC, Guan Y, Soenen DR, *et al*. Potent reversal of multidrug resistance by ningalins and its use in drug combinations against human colon carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer, Chemother Pharmacol*, 2005, 56(4): 379-390.
- 3 Feng RH, Zhu ZG, Li JF, *et al*. Inhibition of human telomerase in MKN-45 cell line by antisense hTR expression vector induces cell apoptosis and growth arrest. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 436-40.
- 4 韩明权, 刘嘉湘, 高虹, 等. 益肺抗瘤饮对实验性肺癌细胞周期及核酸和蛋白质合成的影响. *中西医结合学报*, 2003, 1(3): 205-208.
- 5 李雁, 汤钊猷, 叶胜龙, 等. 不同转移潜能人肝癌单克隆细胞株的分离和建立. *中华肝胆外科杂志*, 2001, 7(11): 681-685.
- 6 Findling-Kagan S, Sivan H, Ostrovsky O, *et al*. Establishment and characterization of new cellular lymphoma model expressing transgenic human MDR1. *Leuk Res*, 2005, 9(4): 407-414.
- 7 马强, 张振书, 王群英, 等. 结肠癌细胞多药耐药模型 LoVo/Adr 的建立及其耐药相关基因的表达. *中华消化杂志*, 2002, 22(7): 412-415.
- 8 张丽, 白剑峰, 佐田尚宏, 等. 阶梯式诱导法建立抗 5-FU 细胞株 MiaPaca2-5-FU. *临床医药杂志*, 2004, 17(4): 1-5.
- 9 Volm M. Multidrug resistance and its reversal. *Anti-cancer Res*, 1998, 18(4C): 2905-2917.
- 10 Plasencia C, Rooney P H, Taron M, *et al*. Chromosomal imbalance maps of human 5FU-resistant colorectal cancer cell lines: implications in the analysis of 5FU-acquired resistance mechanisms. *Int J Oncol*, 2003, 22(5): 945-953.
- 11 Rebbaa A. Targeting senescence pathways to reverse drug resistance in cancer. *Cancer Lett*, 2005, 219(1): 1-13.
- 12 何建明, 梁后杰, 边志衡, 等. 肺腺癌细胞株体外三维培养模型的建立及其药物敏感性的观察. *第三军医大学学报*, 2004, 26(8): 704-706.
- 13 Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia*, 2003, 17(6): 1175-1182.