

C 组	100	348.2 ± 60.6	35.18 ⁻²
D 组		537.2 ± 58.4	

注:与 D 组比较, *¹P < 0.01, *²P < 0.05

由表 1 可见, 2.5% 的敌百虫明显降低小鼠血清 AChE, 与 0.9% 氯化钠注射液比较, 差异有极显著性 ($P < 0.01$); 10%, 20% 甘露醇可降低小鼠血清 AChE, 与 0.9% 氯化钠注射液比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 甘露醇抑制 AChE 有剂量依赖性。由表 2 可见, 2.5% 的敌百虫降低兔血清 AChE, 与 0.9% 氯化钠注射液比较, 差异有极显著性 ($P < 0.01$); 10%, 20% 甘露醇抑制家兔血清 AChE, 与 0.9% 氯化钠注射液比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 甘露醇抑制 AChE 有剂量依赖性。

3 讨论

胆碱酯酶分为两种:一种为乙酰胆碱酯酶, 又称真性胆碱酯酶 (true cholinesterase, AChE); 另一种为丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase, BuChE), 也称假性胆碱酯酶。AChE 主要分布于神经组织, 如脑白质和灰质、脊髓、神经节内的神经细胞和神经肌肉接头, 还分布于红细胞和血清等非神经组织中^[4]。该酶催化神

经末梢释放的胆碱 (ACh) 水解, 从而保证了胆碱神经正常的生理功能。BuChE 主要分布于肝、胰、心、肠黏膜及血浆, 神经组织 (如脑白质、神经细胞髓鞘) 中也有分布, 其生理意义有待深入研究。有机磷酸酯是 AChE 强烈的抑制药, 本实验用敌百虫作阳性对照, 结果表明, 甘露醇对小鼠、家兔外周血清 AChE 有抑制作用, 其抑制作用的强弱具有剂量依赖性, 但其抑制作用明显低于敌百虫。有关甘露醇抑制 AChE 活性的作用机制, 以及对动物中枢部位的 AChE 是否有抑制作用有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 韩妍, 王冰. 老药新用——甘露醇[J]. 实用心脑血管病杂志, 2002, 10(4): 254-255.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 184-185.
- [3] Ellman G L, Courtney K O, Andres V J, et al. A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(1): 88-92.
- [4] 沈伽第. 胆碱酯酶的基础与临床研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2000, 24(4): 295-297.

人骨肉瘤多药耐药细胞模型建立及生物学形状分析

许小涛¹, 刘先洲²

(1. 武汉大学人民医院肿瘤科, 430060; 2. 武汉大学医学院微生物学教研室, 430060)

[摘要] 目的: 建立人骨肉瘤细胞多药耐药 (MDR) 细胞亚系。方法: 采用多柔比星间断冲击法诱导骨肉瘤细胞, 并用免疫荧光法检测 P-糖蛋白 (P-gp) 的表达、四唑蓝 (MTT) 比色法对 MDR 表型鉴定和多柔比星结合实验法检测肿瘤细胞耐药性及耐药逆转药。结果: 该实验建立 6 株 MDR 细胞亚系 MG-63/R₁₋₆, 免疫荧光术可以检测到 P-gp 的表达, MTT 比色法、多柔比星结合试验方法显示各亚系细胞的多药耐药性明显增加, 并且维拉帕米可以拮抗 P-gp 的作用。结论: Mdr-1/P-gp 在 MDR 的特性上起着至关重要的作用, 这些骨肉瘤 MDR 细胞亚系模型为进一步研究骨肉瘤耐药特征及逆转方法奠定基础。

[关键词] 多柔比星; 骨肉瘤; 多药耐药; 细胞模型

[中图分类号] R979.1; R965.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2004)10-0716-03

Establishment of Multidrug-resistant Human Osteosarcoma Subclones

XU Xiao-tao¹, LIU Xian-zhou² (1. Department of Oncology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Department of Microbiology, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT Objective: To establish multidrug-resistant (MDR) subclones of human osteosarcoma. **Methods:** The human osteosarcoma cell line MDR was subjected to a series of short-time pulse exposures to doxorubicin in 6 increasing concentrations beginning from 0.01 to 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The procedure was repeated over and over again and the experiment lasted 5 months. The phenotype of the subclones was analyzed with MTT colorimetry. P-glycoprotein (P-gp) was detected with immunofluorescence. Drug resistance of tumor cells and drug resistance reversing agents were tested with the doxorubicin-binding assay (ABA). **Results:** 6 subclones of the MDR cell line, MG63/R₁₋₆, were established. P-gp expression on these cells was demonstrated by immunofluorescence. MTT colorimetry and ABA revealed that the multidrug-resistance of all 6 subclones was strikingly stronger than that of the parent cell line. Besides, verapamil was shown to antagonize the effect of P-gp. **Conclusion:** Expression of Mdr-1/P-gp was shown to be the key factor to regulate the MDR phenotype of osteosarcoma. These

newly described multidrug-resistant osteosarcoma subclones are useful models for further study of the features of drug resistance of osteosarcoma and for the development of methods to reverse the drug resistance.

KEY WORDS Doxorubicin; Osteosarcoma; Multidrug-resistance; Cell subclone

骨肉瘤是常见的一种骨源性恶性肿瘤^[1],虽然新辅助化疗使患者的生存率大幅度提高,但仍有 20% ~ 40% 的患者因为转移及复发而死亡。治疗失败的主要原因是肿瘤细胞对化疗药物的耐药性。多种机制同肿

[收稿日期] 2004-01-11 [修回日期] 2004-03-11

[作者简介] 许小涛(1974-),女,湖北武汉人,主治医师,硕士,从事肿瘤生物学研究工作。

瘤细胞的耐药性有关。而骨肉瘤的研究中最经典的机制是多药耐药因子(Mdr-1)表达 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)引发的抗癌药物被泵出肿瘤细胞而达到多药耐药(MDR)。Mdr-1/P-gp 在多种恶性肿瘤中有强表达,据报道 Mdr-1 表达同多种肿瘤的预后有高度的相关性。本实验采用大剂量多柔比星间断冲击疗法建立人骨肉瘤耐药细胞株 MG-63/R,并对其基本特征及交叉耐药性进行检测,以期对临床骨肉瘤化疗和耐药机制的研究提供理想的实验模型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 MG-63 成人骨肉瘤细胞系来自武汉大学中国典型培养物保藏中心;四甲基偶氮唑盐(MTT)为华美生物工程公司产品;多柔比星为日本产品;乙酰乙酸荧光素(fluorescent diacetate, FDa),基因公司产品;丝裂霉素(MMC),日本协和公司产品;足叶乙苷(VP-16),北京制药厂;顺铂(cisplatin)为锦州制药一厂产品;甲氨蝶呤(methotrexate)、长春新碱(vincristine)、甲氮唑胺(dacarbazine)购自华中科技大学同济医学院附属同济医院药房。各种药物用 0.9% 氯化钠注射液稀释成相应浓度,分装后 -20℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 人骨肉瘤 MDR 亚系的诱导 ①将 MG-63 细胞接种于 6 孔板,当细胞计数 1×10^6 ,多柔比星浓度 $0.01 \sim 4.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,分为 6 个药物浓度梯度,冲击处理骨肉瘤细胞 24 h,用无抗癌药的 DMEM 培养基,培养尚存活的细胞。当细胞数到 1×10^7 时,再转入 6 孔板重新以大剂量多柔比星处理 MG-63 细胞,如此反复,直至 MG-63 可以稳定生长于 $4.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多柔比星的 DMEM 培养基中,历时约 5 个月。并将诱导过程中在含多柔比星 $0.01, 0.04, 0.10, 0.40, 1.00, 4.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养基中能稳定生长的细胞,分别称为 MG-63/R₁, MG-63/R₂, MG-63/R₃, MG-63/R₄, MG-63/R₅, MG-63/R₆。②将 MG-63/R₆ 置于不含多柔比星的培养基中,分别培养 4 周和 8 周。

1.2.2 细胞生长动力学测定 分别将 MG-63、MG-63/R_{1~6} 细胞按 $2 \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$, $150 \mu\text{L}$ 接种于 96 孔培养板,培养 1 ~ 7 d。采用 MTT 比色法分别测定上述 7 株细胞吸光度(A)值。

1.2.3 P-gp 的检测 培养皿中加入盖玻片并接种细胞悬液,待细胞汇合后,用丙酮固定,先用 P-gp 单克隆抗体 C219(试剂盒购自博士德公司),在 4℃ 的冰箱中孵育 24 h,再用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠 IgG,置于荧光显微镜下观察^[2,3]。

1.2.4 MDR 表型鉴定 用 MTT 比色法计算药物对肿瘤细胞体外抑制率(ID), $ID(\%) = (1 - \frac{\text{用药孔 A 值}}{\text{无药对照孔 A 值}}) \times 100\%$ 。计算各种药物对细胞 50% 抑制率药物剂量(IC₅₀),计算相对耐药度(RF), $RF = \frac{\text{耐药细胞 IC}_{50}}{\text{亲代细胞 IC}_{50}}$ 。

1.2.5 多柔比星结合实验方法检测肿瘤细胞耐药性及耐药逆转剂 ①胰酶收获细胞后,转入含多柔比星 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养基中,37℃ 二氧化碳培养箱中放置 30 min,然后加入含 2% FDa 的无糖 PBS,并放入 4℃ 冰箱终止多柔比星的反应,15 min 后用 PBS 低速离心洗涤 2 次,然后重悬于 PBS 中,涂片、盖片、封胶后立即在 200 倍的荧光显微镜下观察。②胰酶收获细胞后,转入含多柔比星 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及维拉帕米 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养基中,37℃ 二氧化碳冰箱中放置 30 min 后,处理同前。

1.3 统计学方法 计量资料组间比较用 *t* 检验,计数资料两组间比较用 χ^2 检验和等级相关分析法,用 SPSS10.0 统计软件计算。

2 结果

2.1 经过 5 个月诱导 MG-63、MG-63/R_{1~6} 细胞分别在含多柔比星 $0.01, 0.04, 0.10, 0.40, 1.00, 4.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养基中生长, MG-63 细胞呈梭形,大小一致,而 MG-63/R 细胞呈多角形,大小不均。

2.2 P-gp 表达检测 Mdr-1 表达产物 P-gp 特异地同荧光标记抗体结合, P-gp 主要表达在细胞膜及细胞质中, MG-63/R 细胞亚系中表达的 P-gp 同抗体结合在蓝色荧光的激发下 FITC 发出较亮的绿色荧光。

2.3 体外药物的敏感性 见表 1。用 MTT 法检测细胞系对抗肿瘤药物的耐药程度的变化,耐药程度以 IC₅₀ 来衡量,可见随着处理的多柔比星浓度增高细胞交叉耐药程度也明显增加。

表 1 MTT 比色法检测细胞体外药物的敏感性

药物	MG-63			MG-63/R ₁		MG-63/R ₂		MG-63/R ₃		MG-63/R ₄		MG-63/R ₅		MG-63/R ₆	
	IC ₅₀	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF
多柔比星	0.13	0.21	1.6	0.63	4.8	1.54	11.8	4.3	33.0	6.4	49.2	9.3	71.5		
丝裂霉素	0.10	0.21	2.1	0.34	3.4	0.43	4.3	0.67	6.7	0.70	7.0	0.68	6.8		
长春新碱	0.004	0.008	2.0	0.012	3.1	0.034	8.7	0.038	9.7	0.044	11.2	0.04	11.0		
氨甲蝶呤	0.022	0.017	0.8	0.024	1.1	0.020	0.9	0.023	1.1	0.028	1.3	0.03	1.5		
甲氮唑胺	11.0	9.0	0.8	8.0	0.7	13.0	1.2	36.0	3.2	73.0	6.6	106.0	9.6		
足叶乙苷	0.071	0.103	1.5	0.185	2.6	0.390	5.5	0.531	7.5	0.706	9.9	0.88	12.3		
顺铂	0.62	0.78	1.3	0.84	1.4	0.92	1.5	1.40	2.3	1.82	2.9	2.03	3.3		

注:IC₅₀为50%的细胞被抑制时的药物浓度,单位 μg · mL⁻¹

2.4 多柔比星结合试验(ABA)检测细胞内多柔比星累积程度 当用蓝光激动时进入细胞内的 FDa 发出绿色荧光,当用绿光激动时,只有少数耐药细胞可发出红色荧光,当加入逆转药维拉帕米时,可见细胞内多柔比星的累积明显增加,多柔比星结合率分别为 9.8%, 51.0%。说明骨肉瘤细胞系对多柔比星的耐药性可以用维拉帕米逆转。

3 讨论

考虑到肿瘤细胞耐药性的产生总是发生在其与化学物质(抗癌药或致癌化学物质)接触之后。因此,本研究采用骨肉瘤治疗实践中常用的抗癌药物诱导的方法建立 MDR 细胞模型。而且大多数肿瘤模型的建立,均是应用持续用药处理方法,而本实验采用间断大剂量冲击诱导,这样更加接近于临床化疗的实际,也是为肿瘤耐药的研究提供一个更接近于临床的耐药模型,而且所需时间比文献报道的 10 个月时间要大大缩短。经过 5 个月多柔比星的体外诱导, MG-63/R 人骨肉瘤细胞亚系不仅对多柔比星产生耐药性, MG-63 也对 VCR, VP-16 等多种抗癌药产生耐药性。说明通过单一药物诱导可促使肿瘤细胞产生 MDR。通过实验结果可见 MG-63/R 有高表达 P-gp, 从多柔比星结合试验中可见 MG-63/R 的确是一种耐药表现的人骨肉瘤细胞亚系。肿瘤细胞的耐药性的产生是多种耐药机制的共同作用的结果,其中一个重要的机制就是 Mdr-1 介导的 P-gp。文献报道 P-gp 高表达的肿瘤细胞主要对蒽环类抗生素、长春碱类及鬼臼毒素类等抗肿瘤药产生耐药性,而对烷基类、抗代谢药及顺铂等抗癌药不起作用,一般把 Mdr-1/P-gp 介导的耐药途径称为经典耐药机制^[4,5]。本实验诱导耐药的早期细胞株确实符合这一特点,如 MG-63/R₁₋₃, 随着诱导 MG-63/R₄₋₆ 逐渐对顺铂也表达出了耐药性。在 Mdr-1/P-gp 经典的耐药途径之外尚存非经典的耐药途径^[6], 如 MRP、谷胱甘肽和拓扑异构酶等。从实验结果看,在多柔比星诱导产生 Mdr-1 高表达时,其他的耐药机制也同时呈现

出了各自的特点,也可以认为骨肉瘤的耐药表型并非一种机制单一作用的结果,而是多种机制共同作用的结果,这些机制是相互影响、相互关联的。

从 MTT 试验可以看出对肿瘤的化疗用 >2 种的抗癌药物同时给药可以达到更好的治疗结果,因此临床制定化疗方案时,应结合患者实际情况采取个性化方案。应针对具体的多药耐药机制采取措施减少或逆转多药耐药。化疗药物联合应用干扰素及钙离子(Ca²⁺)通道阻滞药等 MDR 逆转药能增强疗效。ABA 法比较直观反映运用多药耐药调节药的效果:维拉帕米等明显地增加多柔比星在细胞内的积累,增强了对多柔比星敏感性。但维拉帕米^[7]等 Ca²⁺ 通道阻滞药的 MDR 调节药对正常组织的副作用限制了这类药物的应用,因此要研究更多副作用小的耐药逆转药。而实验建立的细胞株可以为进一步研究 MDR 逆转药提供条件。

目前临床上用于骨肿瘤刮除及边缘切除后填充骨缺损的多柔比星与骨水泥,在临床使用期间大幅提高了患者无瘤生存率,但用药单一,而且不管是初发还是复发病例小剂量长时间的作用。容易引起骨肿瘤细胞多药耐药性^[8]。因此治疗方案既要考虑耐药产生的可能性,又要根据药动力学来安排。耐药现象是临床辅助化疗失败的主要原因,笔者相信本实验建立的 MG-63/R 人骨肉瘤耐药细胞亚系,可以为骨肉瘤 MDR 的发生、发展及转归的研究提供一个很好的实验模型,也可以对骨肉瘤细胞耐药稳定性、耐药骨肉瘤细胞转移及侵袭能力进行评价,并为从现有抗癌药中找寻对有骨肉瘤耐药表现的患者最合理的化疗方案提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 曾 恒,杨彩虹,陈安民. 骨肉瘤预后与 mdr-1/P170 的临床意义[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27(增刊): 290-293.
- [2] Oda Y, Matsumoto Y, Harimaya K. Establishment of new

multi-drug-resistant human osteosarcoma cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(4):859-866.

[3] Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(1):164-170.

[4] Page R L, Hughs C S, Huyen S, et al. Modulation of P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in canine cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(5):3 533-3 538.

[5] Shibao k, Takano H, Nakayama Y, et al. Enhanced coexpress-ion of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha

genes in human colorectal carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 1999, 7 383(6):732.

[6] Kim H S, Park Y B, Ohjk H, et al. The cytotoxic effect of methotrexate loaded bone cement on osteosarcoma cell lines [J]. *Int Orthop*, 2001,25(6):343-348.

[7] Wunder J S, Bull S B, Aneliunas V, et al. Mdr-1 gene expression and outcome in osteosarcoma; a prospective, multicenter study [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18 (14): 2 685-2 694.

[8] Takashita H, Kusuzaki K, Ashihara T, et al. Intrinsic resistance to chemotherapeutic agents in murine osteosarcoma cells [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2000,82(7):963-969.

灯盏花素缓释滴丸对家兔血液流变学的影响

刘 宏¹,汤 韧¹,周林珠²,王 影²,唐晓养²,杨祥良²

(1. 广州军区武汉总医院药剂科,武汉 430070;2. 华中科技大学药物研究所,武汉 430074)

[摘 要] 目的:研究灯盏花素缓释滴丸对家兔血液流变学的影响。方法:家兔 16 只,随机分为 3 组,B 组灌胃给予灯盏花素缓释滴丸 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,A 组给予同等剂量的灯盏花素片的混悬液,对照组给予 0.9% 氯化钠注射液 15 mL · d⁻¹,均连续给药 7 d,测定给药后的血液流变学指标。结果:B 组对家兔的全血粘度、血浆粘度、血细胞比容及红细胞变形指数的作用均强于 A 组。结论:A、B 组比较,B 组具有更强的生物学效应。

[关键词] 灯盏花素;缓释滴丸;血液流变学

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2004)10-0719-02

Effect of Scutellarin Sustained-release Dropping Pills on Hemorrhheology of Rabbits

LIU Hong¹, TANG Ren¹, ZHOU Lin-zhu², WANG Ying², TANG Xiao-qiao², YANG Xiang-liang² (1. Department of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, Wuhan 430070, China; 2. Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of scutellarin sustained-release dropping pills on hemorrhheology of rabbits.

Methods: 16 rabbits were randomly divided into 3 groups: A, B and C. Rabbits of group B, A and C were given each daily by gastrogavage 40 mg · kg⁻¹ of scutellarin sustained-release dropping pills, suspension of 40 mg · kg⁻¹ powdered scutellarin tablets and equal amount of normal saline, respectively, for 7 consecutive days. Indices reflecting hemorrhheology of the animals were then determined. **Results:** In comparison with scutellarin tablets, scutellarin sustained-release dropping pills were shown to have stronger effects in improving whole blood viscosity, plasma viscosity, hematocrit and erythrocyte deformation of the rabbits.

Conclusion: Scutellarin sustained-release dropping pills were shown to possess stronger biological effects as compared with those of scutellarin tablets.

KEY WORDS Scutellarin; Sustained-release dropping pills; Hemorrhheology

灯盏花素是从云南灯盏花 [*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz] 全草中分离出的黄酮类有效成分,主要用于闭塞性脑血管疾病及所致的瘫痪、脑出血所致之后遗症和多种心脑血管疾病,如脑梗死、冠心病、心绞痛、原发性高血压、高粘滞血症等的治疗^[1]。灯盏花素缓释滴丸是笔者采用固体分散技术与缓释技术相结合的一种具有缓释功能的灯盏花素滴丸制剂。为了进一步评价该制剂技术对灯盏花素药效学的影响,笔者比较了灯盏花素缓释滴丸及普通灯盏花素片对家兔血液流变学指标的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂 灯盏花素缓释滴丸(自制),灯盏花素片(云南玉溪药业有限公司,批号:001206,每片 20 mg),其余试剂为市售分析纯。

1.2 仪器 LBY-N6K 型血液流变仪(北京普利生仪器有限公司)。

1.3 动物 家兔 16 只,雌雄各半,体重 1.5 ~ 2.0 kg,湖北省卫生防疫站实验动物中心提供。

1.4 家兔血液流变学的测定 将 16 只家兔随机分为