

## · 实验研究 ·

## 耐药 VX2 肝癌模型的建立

刘瑞宝 徐克 李枫 富宏 苏洪英 肖亮 周玉斌

【摘要】 目的 探讨应用经化疗药物诱导后传代的 VX2 肿瘤建立移植性耐药肝癌模型的可行性。方法 将 20 只大耳白兔随机分为 4 组 建立肝癌模型。A、B 组和 C、D 组植入肿瘤分别取自常规传代和药物诱导后的传代兔。模型建立 3 周后 增强 CT 检查确定肿瘤大小。直视下穿刺肝动脉 ,A、C 两组注入阿霉素(4mg/2ml) ,B、D 两组注入等量生理盐水。1 周后 CT 复查 ,比较各组肿瘤倍增率。流式细胞仪检测各组肿瘤凋亡率。结果 模型建立 3 周后各组肿瘤大小无明显差异。治疗 1 周后增强 CT 复查 ,各组肿瘤体积均增大。其中 ,A 组肿瘤倍增率显著低于其他组( $P < 0.05$ ) ;C 组低于 B、D 组 ,但各组间差异无显著性( $P > 0.05$ )。A 组肿瘤凋亡率显著高于其他组( $P < 0.05$ ) ;C 组高于 B、D 组 ,但组间差异无显著性( $P > 0.05$ )。结论 通过药物诱导建立的移植性兔 VX2 肝癌模型具有明显耐药特征 ,可作为耐药肝癌模型用于肝癌全身与介入性药物治疗的实验研究。

【关键词】 肝癌 ;多药耐药 ;动物模型 ;VX2 肿瘤

**Establishment of the MDR model in rabbit liver with VX2** LIU Rui-bao , XU Ke , LI Feng , et al. Department of Radiology , Third Hospital , Harbin Medical University , Harbin 150040 , China

【Abstract】 **Objective** To investigate the feasibility of establishing tumor model of MDR in rabbit liver with VX2 tumor induced by adriamycin. **Methods** 20 white rabbits were randomly divided into 4 groups with 5 for each. Liver tumor was established with VX2 tissue together with or without MDR-induced for their formations. VX2 tumor without MDR-induced was included in group A and B ,while MDR-induced tumor was employed in groupe C and D. Contrast enhanced CT was performed three weeks later to assess the volume of tumors. 4 mg adriamycin( dilute with 2ml of saline ) was infused in group A and C via the common hepatic artery directly and respectively ; whereas same amount of saline adminisfrated through the same way for group B and D. Follow up CT was performed one week later to assess the change of tumor. Apoptosis rate was analized for each group by means of flow cytometry( FCM ). **Results** No significant difference was found between the 4 groups three weeks after the establishment in term of tumor volume. Follow up CT performed 1 week after the treatment showed the volume increase of tumor for all groups. Group A was significantly lower than the other three groups in tumor growth rate(  $P < 0.05$  ). No significant difference was found between the other three groups(  $P > 0.05$  ). The apoptosis rate of group A detected by FCM was significantly higher than the other three group(  $P < 0.05$  ). No significant difrence was found between group B , C and D(  $P > 0.05$  ). **Conclusion** Implanted liver tumor with VX2 induced by , adriamycin in tumor carrying rabbits possesses the character of drug resistance , which is profitable to be a liver tumor model of MDR for the therapeutic trial.

【Key words】 Liver carcinoma ; Multidrug resistance ; Animal model ; VX2 tumor

肝动脉化疗栓塞术( transcatheter arterial chemo-embolization ,TACE )是非手术治疗原发性肝癌( HCC )的首选方法。研究表明 HCC 存在的多药耐药( multidrug resistance ,MDR )机制限制了其疗效<sup>[1]</sup>。目前 ,肿瘤耐药研究多以细胞系为主 ,尚无可以用于介入治疗研究的耐药肝癌模型<sup>[2-4]</sup>。建立具有耐药特征

的肝癌模型对于进一步研究 MDR 对介入治疗疗效影响 ,以及 MDR 逆转在 HCC 介入治疗中的可行性具有重要意义。本研究旨在利用 VX2 肿瘤组织特性<sup>[5,6]</sup> ,通过药物诱导 ,探讨建立移植性耐药肝癌模型的可行性。

## 材料和方法

## 一、实验动物

健康大耳白兔 30 只 ,雌雄不限 ,体重 2.5 ~ 3.0 kg ,由中国医科大学动物部提供。10 只用于肿瘤传

代及耐药诱导 20 只用于建立移植性肝癌模型。携带 VX2 肿瘤兔 2 只 ,由华中科技大学协和医院冯敢生教授、李欣博士惠赠。

二、肿瘤传代与耐药诱导

应用速眠新( 长春畜牧大学生产 )0.2 ~ 0.3 ml/kg 肌肉注射麻醉携带 VX2 肿瘤兔 ,无菌条件下取肿瘤组织制成悬液。用 20ml 注射器抽取 1 ml 肿瘤悬液 ,注入健康兔大腿内侧肌肉传代。2 周后 肿瘤直径可达 2 cm。经耳廓后静脉注入阿霉素 4 mg( 5 ml 生理盐水稀释 ) ,每周 1 次 ,连续 3 周。第 3 次化疗 1 周后切除肿瘤组织 ,再次传代。共进行 3 次传代 ,每次传代进行 3 次化疗。

三、肝脏肿瘤接种

将 20 只健康大耳白兔随机分为 A、B、C、D 4 组 ,每组 5 只 ,麻醉后无菌条件下开腹。暴露肝脏 ,在左叶中部用眼科镊子剥离被膜 ,刺入 3 ~ 4 mm 深 ,将 1 mm × 1 mm × 1 mm 新鲜肿瘤组织植入。其中 A、B 2 组所用肿瘤组织取自常规传代兔 ,C、D 2 组取自经过化疗( 耐药诱导 )传代兔。肿瘤组织植入后 ,外用小块明胶海绵填塞 ,防止出血和肿瘤组织外露。

四、CT 检查和肝动脉灌注化疗

肿瘤接种 3 周后 麻醉下进行 CT 检查。扫描条件为 120 kV ,180 mA ,层厚、层距均为 3 mm。全部行平扫和增强扫描。增强时 ,经耳廓后静脉注入 40 % Angiografin 5 ml 8 ~ 10 s、30 ~ 40 s 后分别进行病灶同层扫描。

无菌条件下 ,沿腹中线开腹 ,暴露肝动脉 ,直视下用自制的穿刺针穿刺肝动脉。A、C 2 组缓慢注入阿霉素 4 mg( 2 ml 生理盐水稀释 ) ;B、D 2 组( 对照组 )注入等量生理盐水。拔出穿刺针 ,止血后关腹。1 周后 CT 复查 ,分析各组肿瘤倍增率。处死全部兔 ,取边缘肿瘤组织 ,制成单细胞悬液。PI 染色 ,FAC-scan 流式细胞仪检测各组肿瘤细胞凋亡率。

五、统计分析

应用 SPSS10.0 统计学软件 ,采用方差分析 ,分析治疗后各组肿瘤倍增率及凋亡率 , $P < 0.05$  为差异有显著性。

结 果

一、肿瘤传代与接种

传代 1 周后可摸到肿瘤 ,2 周后肿瘤直径达 2 cm。药物诱导后传代 ,肿瘤组织生长速度无明显变化。20 只兔肝脏内肿瘤接种全部成功 ,3 周后增强 CT 检查显示病灶无强化 ,边缘光整 ,与正常肝组织

分界清楚。肿瘤大小见表 1 ,各组肿瘤大小无明显差异(  $P > 0.05$  )。

表 1 各组兔 VX2 肝移植瘤治疗前后大小  
(  $n = 20$  , $\bar{x} \pm s$  ) ( mm )

组别	治疗前		治疗后	
	最大径	最小径	最大径	最小径
A	20.40 ± 2.30	14.40 ± 1.67	30.80 ± 2.86	21.00 ± 2.35
B	20.80 ± 2.59	14.00 ± 1.22	31.70 ± 2.33	22.00 ± 1.58
C	20.20 ± 2.39	14.40 ± 1.14	31.20 ± 1.64	22.00 ± 1.00
D	21.00 ± 1.87	13.80 ± 1.48	31.40 ± 3.65	21.80 ± 1.79

二、肝动脉灌注化疗

经肝动脉注入阿霉素或生理盐水 1 周后 ,各组肿瘤均增大( 见表 1 )。比较各组倍增率 ,A 组显著低于其他组(  $P < 0.05$  ) ,其余各组之间差异无显著性( 表 2 )。

表 2 各组兔 VX2 肝移植瘤治疗前后体积变化  
(  $n = 20$  , $\bar{x} \pm s$  ) ( mm<sup>3</sup> )

组别	V1	V2	倍增率( % )
A	2130.80 ± 537.61	6886.40 ± 1908.32	222 ± 14 <sup>a</sup>
B	2039.00 ± 344.73	7732.80 ± 1402.49	281 ± 47 <sup>b</sup>
C	2083.30 ± 247.86	7562.80 ± 799.76	264 ± 22 <sup>c</sup>
D	2037.80 ± 580.23	7548.10 ± 1812.66	274 ± 23 <sup>d</sup>

肿瘤体积( V ) =  $1/2ab^2$  , $V_1$ 、 $V_2$  为治疗前、后肿瘤体积。倍增率 =  $( V_2 - V_1 ) / V_1 \times 100\%$  , $P_{ab}$ 、 $P_{ac}$ 、 $P_{ad} < 0.05$  ; $P_{bc}$ 、 $P_{bd}$ 、 $P_{cd} > 0.05$

三、肿瘤细胞凋亡

经流式细胞仪检测 ,各组肿瘤凋亡率见表 3。其中 ,A 组肿瘤凋亡率高于其他各组 ,差异有显著性(  $P < 0.05$  )。C 组高于 B、D 2 组 ,但各组间差异无显著性(  $P > 0.05$  )。

表 3 各组肿瘤凋亡率(  $n = 20$  , $\bar{x} \pm s$  )

组别	例数	凋亡率( 100% )
A 组	5	4.57 ± 0.94 <sup>a</sup>
B 组	5	2.33 ± 0.60 <sup>b</sup>
C 组	5	3.12 ± 0.59 <sup>c</sup>
D 组	5	2.40 ± 0.45 <sup>d</sup>

$P_{ab}$ 、 $P_{ac}$ 、 $P_{ad} < 0.01$  ; $P_{bc}$ 、 $P_{bd}$ 、 $P_{cd} > 0.05$

讨 论

MDR 普遍存在于恶性肿瘤之中 ,有的肿瘤在治疗前就出现耐药( 内在性耐药 ) ,有的在应用化疗药物后出现耐药( 获得性耐药 )。据美国癌症协会估计

和报道,每年美国癌症患者约 49 万例死亡,90% 以上的肿瘤患者不同程度上受耐药影响,其中 61% 肿瘤属于内在性耐药,33% 属于获得性耐药。肿瘤耐药是肿瘤治疗的一大难题及研究热点<sup>[7]</sup>。

肿瘤耐药机制复杂,建立理想的耐药模型对研究肿瘤耐药机制及治疗有重要意义。目前,建立肿瘤耐药模型常用方法有低药物浓度递增持续作用法和大剂量药物间歇诱导法,两者均引起肿瘤耐药<sup>[8]</sup>。实验研究以低药物浓度递增持续作用法诱导细胞系耐药为主。临床肿瘤化疗一般采用间歇性大剂量给药。治疗初期肿瘤缩小明显,随着用药次数的增多耐药表达增加,化疗逐渐不敏感,即产生了耐药,或在原有耐药基础上耐药表达增强。Warmann 等<sup>[4]</sup>将从人体切除的肝胚细胞瘤制成悬液注入到裸鼠皮下建立模型,进行 2 个疗程的化疗,同时对肿瘤术后患者也进行化疗。结果表明,人体内复发的肿瘤和肿瘤模型耐药表达都随化疗次数增加而增高。

TACE 是治疗不可切除性肝癌的首选方法,随着治疗次数的增多,残存 HCC 耐药表达增加,肿瘤耐药是残留 HCC 生存的主要机制<sup>[9]</sup>。然而,细胞系以及裸鼠模型缺乏与肝癌介入治疗相近的条件,不适合介入治疗研究。因此,建立可用于介入治疗研究的耐药肝癌模型对于进一步明确 MDR 对肝癌介入治疗疗效影响,以及研究 MDR 逆转在肝癌介入治疗中的可行性具有重要意义。

VX2 肿瘤细胞株是由 Shope 病毒在兔身上诱发的乳头状瘤恶变而成的鳞癌,经数十代传代建立,为稳定的可移植性细胞株,可种植到兔肝脏、结肠、肾脏、子宫进行介入治疗研究<sup>[5,6]</sup>。移植性兔 VX2 肝癌模型是目前最大的实验性肝癌模型,为巨块型实体肿瘤,呈浸润性生长,主要由肝动脉供血,血供丰富,与人类巨块型肝癌相似。模型制备简便、周期短、成功率高,已经广泛应用于肝癌介入治疗的基础研究。然而对其耐药特点尚无深入研究。

肝脏移植性 VX2 肿瘤生长迅速,植入后 4 周即可发生中心缺血性坏死,因此,模型建立后无法进行耐药诱导。本实验在肿瘤传代过程中间歇性给药,反复传代、化疗后将肿瘤种植到兔肝建立模型,经肝动脉灌注化疗。结果显示,用未做耐药处理的传代肿瘤种植的肝癌模型化疗后肿瘤倍增率明显降低( $P < 0.05$ );而其他各组间肿瘤倍增率无显著差别( $P > 0.05$ )。表明经耐药诱导建立的肝癌模型较常规模型耐药表达明显增加,具有耐药模型特征。

肿瘤生长除增殖旺盛外,肿瘤细胞凋亡受抑制

是引起肿瘤生长的重要原因。化疗药物是诱导凋亡的主要因素之一<sup>[10-12]</sup>,其机制分为如下阶段:①化疗药物对肿瘤细胞的损伤;②细胞信号传递机制受损诱导凋亡;③易感细胞在化疗药物损伤下进入细胞凋亡的最终应答。MDR 降低了细胞内化疗药物浓度,使化疗药物对肿瘤细胞凋亡诱导能力减弱。我们将应用化疗药物反复诱导的 VX2 肿瘤植入兔肝脏,经肝动脉灌注化疗,其凋亡率显著低于未进行耐药诱导的化疗组( $P < 0.05$ ),与注入生理盐水的对照组无明显差异( $P > 0.05$ )。表明经过耐药诱导的肿瘤出现了获得性耐药,耐药表达增加,化疗药物对凋亡的诱导减弱。

MDR 存在于各种不同组织类型的肿瘤中,通过降低细胞内药物浓度产生耐药,并随用药次数的增多耐药性逐渐增强。实验动物模型只是在一定程度上模拟了人类疾病的全部或部分特征。目前,常用的人类肝癌模型有:①肝癌细胞系、应用肝癌细胞株在裸鼠上建立的模型。两者的生物学特征与人类肝癌一致,但是,均缺乏与介入治疗相似的实验环境。②应用 Walker-256 瘤株在 SD 大鼠上建立的肝癌模型、诱发 Wister 大鼠建立的肝癌模型。由于模型动物的动脉细小、动脉插管难度大,同样不适合介入治疗实验研究。③兔 VX2 肝癌模型。该模型为 Shope 病毒诱发的鳞癌,肿瘤的血供与人类肝癌一致,均为肝动脉供血,经肝动脉插管方便可行。本实验建立的模型尽管在生物学特性上与人类肝癌存在一定差异,但是,其耐药特点与人类肝癌一致。并且,实验中给药方式与人类肝癌介入治疗一致。因此,我们认为在研究肝癌耐药方面,本实验建立的模型是目前可用于介入治疗研究的与人类肝癌特性最接近的实验模型。

综上所述,经反复传代、化疗诱导的肿瘤组织种植到肝脏具有明显的耐药特征,可作为耐药肝癌模型进行实验研究。

## 参 考 文 献

- 1 刘瑞宝,徐克,张曦彤,等.原发性肝癌中多药耐药基因表达及其对介入疗效的影响.中国医学影像技术,2003,19:617-619.
- 2 Schondorf T, Kurbacher CM, Gohring UJ, et al. Induction of MDRI-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines. Anticancer Res, 2002, 22: 2199-2203.
- 3 杨俊霞,汤为学.人肝癌顺铂耐药细胞系的建立及其生物学特征.癌症,2002,21:872-876.
- 4 Warmann S, Hunger M, Teichmann B, et al. The role of the MDRI-gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblasto-

ma. Clinical course and in vivo model. Cancer ,2002 ,95 :1795-1801.

5 Sano B , Sugiyama Y , Kunieda K , et al. Antitumor effects induced by the combination of TNP-470 as an angiogenesis inhibitor and lentinan as a biological response modifier in a rabbit spontaneous liver metastasis model. Surg Today , 2002 , 32 :503-509.

6 Harima Y , Harima K , Hasegawa T , et al. Transcatheter arterial embolization with cisplatin : Apoptosis in VX2 tumor uterus transplants. Anti-cancer Res , 1996 , 16 :193-200.

7 Yeh JJ , Hsu WH , Wang JJ , et al. Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with p-glycoprotein expression. Respiration , 2003 , 70 :32-55

8 Yang LY , Trujillo JM. Biological characterization of multidrug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods. Cancer Res ,1990 , 50 :3218-3225.

9 王义 ,袁海平 ,陈汉 ,等.肝动脉化疗栓塞后残留肝癌细胞的 P-糖蛋白表达.中华实验外科杂志 ,1998 ,15 :15-16.

10 Diaconu CC , Szathmari M , Keri G , et al. Apoptosis is induced in both drug-sensitive and multidrug-resistant hepatoma cells by somatostatin analogue TT-232. Br J Cancer , 1999 , 80 :1197-1203.

11 Cheng AL , Chuang SE , Fine R , et al. Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C , and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen. Biochem Pharmacol , 1998 , 55 :523-531

12 Mochizuki T , Kuge Y , Zhao S , et al. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with 99mTc-annexin V. J Nucl Med , 2003 , 44 :92-97.

( 收稿日期 2003-12-01 )

· 病例报告 ·

贲门失弛缓症球囊扩张致延迟穿孔一例

于学林 董自勇

患者女 ,23 岁。进食困难 1 个月余 ,经我院门诊食管造影和胃镜检查诊断为贲门失弛缓症。用 Cook 公司生产的直径为 4 cm、长为 10 cm 的球囊为患者行扩张术 ,当球囊扩张至尚有一浅切迹 ,再加压扩张时 ,球囊崩裂。随后的食管造影显示钡剂通过食管中下段缓慢 ,未见穿孔。嘱患者口服抗炎及止血药物 3 d。3 d 后患者复诊时 ,自述术后频繁呕吐、低热 ,体温波动于 36.5 ~ 37.8℃ ,伴左侧胸痛。造影见食管下段左侧壁距贲门上方约 3.5 m 处有一约 1.5 cm 的瘘口 ,造影剂进入左侧纵隔 ,提示食管破裂。当日置入一直径为 2.0 cm、长为 12 cm 的被覆膜镍钛合金防反流可回收支架 ,经禁食、静脉补液和抗炎治疗 ,2 d 后体温降至正常。3 d 后开始进食 ,10 d 后经胃镜取出支架 ,食管造影证实破口已愈合。

讨论 :贲门失弛缓症近来采用直径为 3 ~ 4 cm 的球囊扩张 ,已取得较好疗效。然而球囊直径的选择 ,扩张的程度并无统一标准。目前大家公认的是根据患者年龄、身高及体型选择球囊直径的大小 ,但并不十分可靠 ,在极少数患者仍有

发生穿孔的可能性。本例患者发生食管穿孔的主要原因是贲门狭窄以上食管仅轻度扩张 ,扩张治疗时又满足于球囊的全部充盈 ,由于球囊承受的压力过大 ,造成食管穿孔。因此 ,总结经验教训 ①术前准确测量狭窄以上扩张食管宽度 ,据此划分为Ⅰ度 :直径 < 3.5 cm ;Ⅱ度 :直径 3.5 ~ 6.0 cm ;Ⅲ度 :直径 > 6.0 cm。根据狭窄以上食管扩张的程度 ,综合患者的年龄、身高、体型特征 ,Ⅰ度选用直径 3.0 cm、Ⅱ度选用直径 3.5 cm、Ⅲ度选用直径 4.0 cm 的球囊进行扩张 ,球囊扩张时应逐渐加压 ,不要过快、过猛。②将患者的疼痛忍耐程度分为Ⅰ ~ Ⅳ度。Ⅰ度 :有疼痛感觉 ;Ⅱ度 :疼痛明显 ;Ⅲ度 :疼痛剧烈 ,可以忍受 ;Ⅳ度 :疼痛剧烈 ,无法忍受。加压时 ,一般选择在Ⅱ度 ~ Ⅲ度 ,检查前与患者手语约定 ,检查中患者可根据疼痛忍耐程度以手语表示。③术后吞钡造影观察疗效及有无穿孔 ,1 周内注意观察患者有无胸痛、剧烈呕吐、上腹痛、发热以及腹膜刺激征等 ,如有以上情况发生 ,应立即吞钡或食管镜检查 ,发现问题及时处理。

( 收稿日期 2004-03-08 )

作者单位 050082 河北石家庄白求恩国际和平医院放射科



# 耐药VX2肝癌模型的建立

作者：[刘瑞宝](#)，[徐克](#)，[李枫](#)，[富宏](#)，[苏洪英](#)，[肖亮](#)，[周玉斌](#)  
作者单位：[刘瑞宝\(150040, 哈尔滨医科大学附属第三医院\)](#)，[徐克, 富宏, 苏洪英, 肖亮\(中国医科大学附属第一医院\)](#)，[李枫\(大连医科大学附属第一医院\)](#)，[周玉斌\(中山医科大学附属第三医院\)](#)  
刊名：[介入放射学杂志](#)[ISTIC](#)[PKU](#)  
英文刊名：[JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)  
年，卷(期)：2004，13(4)  
被引用次数：2次

## 参考文献(12条)

1. [刘瑞宝, 徐克, 张曦彤](#) 原发性肝癌中多药耐药基因表达及其对介入疗效的影响[期刊论文]-[中国医学影像技术](#) 2003(01)
2. [Schondorf T, Kurbacher CM, Gohring UJ](#) Induction of MDRI-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines 2002
3. [杨俊霞, 汤为学](#) 人肝癌顺铂耐药细胞系的建立及其生物学特征[期刊论文]-[癌症](#) 2002
4. [Warmann S, Hunger M, Teichmann B](#) The role of the MDRI-gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma. Clinical course and in vivo model 2002
5. [Sano B, Sugiyama Y, Kunieda K](#) Antitumor effects induced by the combination of TNP-470 as an angiogenesis inhibitor and lentinan as a biological response modifier in a rabbit spontaneous liver metastasis model 2002
6. [Harima Y, Harima K, Hasegawa T](#) Transcatheter arterial embolization with cisplatin: Apoptosis in VX2 tumor uterus transplants 1996
7. [Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ](#) Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with p-glycoprotein expression 2003
8. [Yang LY, Trujillo JM](#) Biological characterization of multidrug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods 1990
9. [王义, 袁海平, 陈汉](#) 肝动脉化疗栓塞后残留肝癌细胞的P-糖蛋白表达[期刊论文]-[中华实验外科杂志](#) 1998
10. [Diaconu CC, Szathmari M, Keri G](#) Apoptosis is induced in both drug-sensitive and multidrug-resistant hepatoma cells by somatostatin analogue TT-232 1999
11. [Cheng AL, Chuang SE, Fine R](#) Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C, and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen 1998
12. [Mochizuki T, Kuge Y, Zhao S](#) Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with 99mTc-annexin V 2003

## 相似文献(10条)

1. 期刊论文 [李起, 刘作金, 张俊, 石毓君, 龚建平, Li Qi, Liu Zuojin, Zhang Jun, Shi Yujun, Gong Jianping](#) 中药复方肝癌-1号逆转肝癌多药耐药的实验研究 -[消化外科](#)2006, 5(1)  
目的分析中药复方肝癌-1号逆转阿霉素(ADM)诱导的HepG2/ADM细胞的多药耐药性的机制. 方法以亲本细胞HepG2为对照, MTT法观察肝癌-1号对HepG2/ADM细胞的毒性作用; 流式细胞仪检测肝癌-1号作用后细胞表面p-糖蛋白(P-gp)表达阳性率; 逆转录聚合酶链式反应检查多药耐药基因(MDR1) mRNA表达水平; MTT法观察肝癌-1号处理后的HepG2/ADM细胞对阿霉素、表阿霉素、氟尿嘧啶耐药的逆转作用. 结果肝癌-1号<50 μmol/L对HepG2/ADM细胞无明显毒性, 半数抑制率(IC50)为75 μmol/L; 50 μmol/L的肝癌-1号可部分抑制HepG2/ADM细胞P-gp合成及MDR1 mRNA的表达, 可逆转HepG2/ADM的耐药性, 对阿霉素、表阿霉素、氟尿嘧啶的逆转倍数分别为3.94(P<0.01), 1.72(P<0.05), 1.67(P<0.05). 结论肝癌-1号通过抑制HepG2/ADM耐药细胞MDR1 mRNA的表达及P-gp合成, 能部分逆转HepG2/ADM的耐药性.
2. 学位论文 [孟晓燕](#) 蟾毒灵诱导人肝癌多药耐药细胞株BEL-7402/5-FU凋亡的作用及机制研究 2008

【背景】 肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)内在的多药耐药性以及化疗过程中产生的获得性多药耐药性是HCC化疗失败的主要原因之一。迄今为止仍没有发现用于肝癌化学治疗的有效药物,开发新的化学治疗药物仍然是中晚期肝癌内科治疗领域的热点。蟾酥为我国传统的抗肝癌中药材,以蟾酥为主治疗肝癌具有非常悠久的历史。本课题前期研究,发现蟾酥的有效活性成分——蟾毒灵具有很强的抗肝癌作用,有可能成为克服肝癌多药耐药,治疗中晚期肝癌的有效药物。研究发现蟾毒灵具有抑制耐药细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用,但是其具体机制如何,在体内是否具有相同的作用还值得进一步研究。因此,本课题以人肝癌多药耐药细胞株BEL-7402/5-FU为研究对象,在初步证实蟾毒灵能够抑制肝癌多药耐药细胞增殖的基础上,对其诱导凋亡的作用及机制进行了深入探讨,并对其体内抑制肝癌的作用进行了初步观察。

【目的】 研究蟾毒灵诱导人肝癌多药耐药BEL-7402/5-FU细胞凋亡的作用,并探讨其可能机制。建立人肝癌5-氟尿嘧啶获得性多药耐药裸鼠原位移植瘤模型,评价蟾毒灵对肝癌多药耐药模型的抗肿瘤作用。

【方法】  
1、蟾毒灵对人肝癌多药耐药细胞株BEL-7402/5-FU增殖的影响  
MTT法观察蟾毒灵、5-氟尿嘧啶、长春新碱、阿霉素、奥沙利铂、环磷酰胺对人肝癌BEL-7402/5-FU获得性多药耐药细胞株增殖抑制作用。蟾毒灵对亲本及耐药细胞增殖抑制作用的时效、量效关系。

2、蟾毒灵诱导耐药细胞株凋亡的作用  
光镜观察不同浓度(1、0.1、0.01 μM)蟾毒灵作用于人肝癌多药耐药细胞株BEL-7402/5-FU 24 h后细胞形态学改变。激光扫描共聚焦显微镜观察不同浓度蟾毒灵(1、0.1、0.01 μM)作用24 h后细胞凋亡的特征性荧光分布变化。流式细胞术检测不同浓度蟾毒灵(1、0.1、0.01 μM)作用24 h对人肝癌BEL-7402/5-FU细胞株细胞周期及细胞凋亡的作用。

3、蟾毒灵诱导耐药细胞凋亡的机制研究  
免疫细胞化学和Western blot法检测蟾毒灵对人肝癌BEL-7402/5-FU细胞Bcl-XL及Bax蛋白表达的影响。流式细胞术检测蟾毒灵作用后,人肝癌BEL-7402/5-FU细胞线粒体膜电位的变化与时效关系,Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9活性的改变及蟾毒灵对Caspase-9作用的时效-量效关系,并观察Caspase-9特异性抑制剂对蟾毒灵诱导细胞凋亡的影响。

4、蟾毒灵对裸鼠人肝癌多药耐药细胞株BEL-7402/5-FU原位移植瘤模型的作用  
采用“隧道内植入法”建立人肝癌5-氟尿嘧啶获得性多药耐药裸鼠原位移植瘤模型。移植12d后,挑选肿瘤大小相近的裸鼠,随机分为生理盐水组,氟尿嘧啶组(20 mg/kg·d)、蟾毒灵组(1 mg/kg·d)及蟾毒灵(1 mg/kg·d)与5-氟尿嘧啶(20 mg/kg·d)联合用药组(交替给药),给药14 d。治疗结束后采血行肝肾功能及生化检查;游标卡尺测量肿瘤最大径和最小径,计算肿瘤体积;免疫组化法检测生理盐水组TS蛋白表达;HE染色行心、肝、肾组织病理学检查,同时观察肝癌组织病理学改变;TUNEL法检测各组肿瘤组织调亡率。

【结果】  
1、人肝癌BEL-7402/5-FU细胞株对临床常用化疗药5-氟尿嘧啶、长春新碱、阿霉素、奥沙利铂、环磷酰胺的耐药指数分别为:18.6±2.85、10.22±2.85、2.12±0.20、5.91±1.08、8.92±2.46,但对蟾毒灵无明显交叉耐药性,蟾毒灵对人肝癌BEL-7402/5-FU细胞株的增殖抑制作用呈明显的浓度依赖性。

2、蟾毒灵处理细胞24 h后可见部分细胞变圆、脱落悬浮于培养液中,细胞体积大小不一,肿胀、固缩的细胞均可见到,细胞内颗粒增多、光密度增强。

3、经1、0.1、0.01 μM蟾毒灵处理人肝癌BEL-7402/5-FU多药耐药细胞后,G0/G1期细胞分布比例(%)分别为25.58±3.70、48.09±2.49、55.26±1.97,与对照组相比差异均有统计学意义(P<0.01),组间比较差异亦有统计学意义(P<0.01或P<0.05)。G2/M期比例39.78±1.55、32.14±1.14、19.42±1.04,与对照组相比及组间比较差异均具有统计学意义(P<0.01)。

4、1、0.1、0.01 μM 蟾毒灵作用于耐药细胞的调亡率(%)分别为42.58±2.11、23.27±1.02、18.65±1.36,与对照组比较差异有统计学意义(P<0.01);且调亡率1 μM处理组高于0.1 μM组(P<0.01),0.1 μM组高于0.01 μM组(P<0.01)。

5、免疫细胞化学法显示耐药细胞可见Bcl-XL、Bax表达。Western blot显示蟾毒灵组Bcl-XL表达较耐药细胞减少,Bax表达增加。

6、蟾毒灵作用后,细胞线粒体膜电位降低(P<0.01);随蟾毒灵作用时间延长,线粒体膜电位逐渐降低,6 h与24 h、12 h与24 h组间比较差异有统计学意义(P<0.01)。

7、蟾毒灵作用后Caspase-3、Caspase-9活性增强,与对照组比较差异有统计学意义(P<0.01),加入Caspase广泛抑制剂后,活性减弱(P<0.01),而Caspase-8活性未见明显变化(P>0.05)。蟾毒灵作用6、12、24 h后Caspase-9活性均增强,并在24 h内呈明显的时间、浓度依赖性。

8、蟾毒灵处理后,细胞调亡率为(25.37±3.16)%,高于对照组(P<0.01);Caspase-9特异性抑制剂组细胞调亡率为(10.5±2.29)%,低于蟾毒灵组(P<0.01),与空白对照组相比差异无统计学意义(P>0.05)。

9、蟾毒灵对裸鼠原位移植瘤的影响多药耐药裸鼠原位移植瘤模型瘤组织的耐药蛋白TS呈高水平表达。蟾毒灵组肿瘤体积与生理盐水组比较差异有统计学意义(P<0.01),蟾毒灵联合5-氟尿嘧啶组与蟾毒灵组比较差异有统计学意义(P<0.05);Tunel法肿瘤组织细胞调亡率的检测显示,5-氟尿嘧啶组细胞调亡率为(8.7±3.21)%与生理盐水组(5.4±2.53)%比较差异无统计学意义(P>0.05),蟾毒灵组为(29.7±4.54)%及联合用药组(45.634±5.50)%均高于生理盐水组(P<0.01),蟾毒灵组高于5-氟尿嘧啶组(P<0.01),联合用药组高于蟾毒灵组(P<0.01)。肝肾功能、生化指标蟾毒灵组与生理盐水组比较差异无统计学意义(P>0.05),5-氟尿嘧啶组与生理盐水组比较AST及CL-、K+水平差异有统计学意义(P<0.01)。

【结论】  
1、人肝癌多药耐药BEL-7402/5-FU细胞株对蟾毒灵无明显的交叉耐药性,蟾毒灵对其具有增殖抑制作用;蟾毒灵对裸鼠原位移植瘤的生长具有显著的抑制作用,对裸鼠心肝肾等脏器无明显毒副作用。2、蟾毒灵能诱导人肝癌多药耐药细胞株BEL-7402/5-FU细胞调亡;3、增加促调亡蛋白Bax表达、降低抗调亡蛋白Bcl-XL表达,促进线粒体膜电位耗散继而活化Caspase-9可能是蟾毒灵诱导人肝癌多药耐药细胞株BEL-7402/5-FU调亡的机制之一。

3. 期刊论文 [孟晓燕,方凡夫,顾伟 细胞调亡与肝癌多药耐药的研究进展 -现代肿瘤医学2009, 17\(7\)](#)

多药耐药是肝癌化疗无效或渐失效的主要原因之一。肝癌细胞调亡途径的异常与肝癌多药耐药的发生关系密切,本文就细胞调亡与肝癌多药耐药关系进行综述。

4. 期刊论文 [王群,戴宗晴,刘志苏,张有顺 人肝癌多药耐药细胞株survivin蛋白的表达及意义 -山东医药](#)

2005, 45(9)

目的探讨人肝癌多药耐药细胞株survivin蛋白表达与肝癌细胞多药耐药的关系.方法用阿霉素(DOX)浓度梯度递增法,建立人肝癌多药耐药细胞株(Bel-7402/DOX).用流式细胞仪检测肝癌细胞调亡率,同时用蛋白印迹(Western blot)检测其survivin蛋白表达.结果随着培养液中 DOX 浓度的增加Bel-7402/DOX 的调亡率逐渐增加,survivin蛋白的表达逐渐增强.结论Survivin蛋白的表达变化可能与人肝癌细胞获得性耐药有关.

5. 学位论文 [朱虹 肝细胞癌多药耐药的产生与局部微环境关系的实验研究 2005](#)

第一部分:缺氧与肝癌多药耐药的产生  
目的:探讨缺氧环境下人肝癌细胞对化疗药物的抵抗和细胞内多药耐药相关基因的表达,阐明微环境缺氧与肝癌多药耐药性产生的关系,揭示肝癌多药耐药性形成的原因和机制。

方法:将人肝癌细胞系HepG2细胞分别置于不同时间低氧培养,应用流式细胞术检测缺氧细胞在受到化疗药物5-Fu作用后的调亡情况,应用荧光定量聚合酶链反应技术和蛋白免疫印迹技术分别检测每组缺氧HepG2细胞中一组多药耐药相关基因mdr1、MRP1和LRP在mRNA和蛋白水平的表达。

结果:在缺氧条件下,受到化疗药物5-Fu作用的HepG2细胞的调亡指数随着缺氧时间的延长而降低,HepG2细胞中多药耐药相关基因mdr1、MRP1和LRP的表达随缺氧时间的延长而逐渐增高,以MRP1变化更为显著。

结论:缺氧可上调肝癌细胞内多药耐药相关基因mdr1、LRP、MRP1的表达,降低肝癌细胞对化疗药物的敏感性,从而使肝癌获得多药耐药的表型。生长局部微环境的缺氧是诱导肝癌产生多药耐药性的直接原因之一。

第二部分:乙肝病毒感染与肝癌多药耐药的产生  
目的:探讨乙肝病毒X蛋白对肝癌多药耐药性产生的影响,阐明肝癌多药耐药的形成与乙肝病毒感染的关系。

方法:应用脂质体介导技术稳定转染pcDNA3/HBx质粒至HepG2人肝癌细胞株,MTT法检测阿霉素及丝裂霉素作用下转染前后细胞的存活率,Annexin/PI法流式细胞分析术检测转染前后细胞在受到5-Fu作用后的调亡指数(AI),RT-PCR和Westernblot技术分别检测转染前后HepG2内多药耐药相关基因在mRNA和蛋白水平的表达。

结果:MTT法显示阿霉素和丝裂霉素作用下,转染了pcDNA3/HBX质粒的HepG2细胞的IC50明显高于对照组(p<0.05)。5-Fu作用后转染组和对照组的AI1分别是9.83±1.5%VS17.79±1.7%(两者相比P<0.05)。整合了HBX基因的HepG2细胞内多药耐药相关基因在mRNA和蛋白水平的表达也均高于未转染细胞,转染前后相比在mRNA水平mdr1、MRP1、LRP基因的表达分别提高了190%,68%,95%;而在蛋白水平p-gp、MRP1、LRP的表达分别提高了64.3%,87.5%和90.8%。

结论:乙型肝炎病毒x蛋白可上调HepG2细胞内多药耐药相关基因的表达,从而促进肝癌多药耐药性的产生。

第三部分:低糖环境与肝癌多药耐药的产生

目的:探讨局部微环境低糖与肝细胞癌多药耐药性产生的关系及影响机制。

方法:低糖培养HepG2细胞,应用流式细胞术AnnexinV/PI法检测低糖培养的细胞在化疗药物5-Fu作用后的凋亡情况,分别应用荧光定量PCR技术和Western-blot技术检测低糖培养后HepG2细胞内多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA和蛋白水平的表达。

结果:在低糖环境下生长时间越长的HepG2细胞对5-Fu的抵抗越强,而且随着低糖培养时间的增加,5-Fu诱导的HepG2细胞的凋亡高峰延迟。低糖培养的HepG2细胞内多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP在mRNA和蛋白水平的表达随低糖培养时间的延长而升高,以LRP的改变最为显著。

结论:肝癌生长微环境葡萄糖量不足也是肝癌产生MDR的原因之一。低糖可通过上调一组多药耐药相关基因的表达而诱导肝癌的多药耐药性。

第四部分:缺氧诱导因子1α在微环境诱导的肝癌多药耐药形成过程中的作用

目的:探讨缺氧诱导因子1α(HIF-1α)在微环境诱导的肝癌多药耐药(MDR)表型形成过程中的作用和地位,并为预防和逆转肝癌耐药提供有效的新的分子靶点。

方法:运用免疫细胞化学技术分别检测在缺氧、低糖环境下生长或稳定整合了HBX基因的HepG2细胞内HIF-1α蛋白的表达及定位。应用荧光定量PCR技术和Western-blot技术检测上述不同条件下HepG2细胞内HIF-1α在mRNA和蛋白水平的表达。转染pcDNA3/HIF-1α质粒于HepG2细胞,检测转染细胞中多药耐药相关基因mdr1、LRP、MRP1的表达。

结果:在缺氧、低糖环境下生长或稳定整合了HBX基因的HepG2细胞中HIF-1α的mRNA和蛋白均不同程度地高表达,并发生了核转位。pcDNA3/HIF-1α质粒转染HepG2细胞中多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA水平较未转染组分别增加了2.4±0.2\*,2.2±0.3#,2.3±0.48倍(\*t=3.75,P<0.01;#t=3.42,P<0.01;&t=3.26,P<0.01),它们在蛋白水平的改变与之相一致。

结论:肝癌生长的微环境可通过核转位因子HIF-1α在转录水平调控多药耐药相关基因的表达,从而诱导肝癌多药耐药表型的形成;HIF-1α的表达上调是微环境诱导肝癌多药耐药形成的中心环节;HIF-1α有望成为预防和逆转肝癌耐药的新的分子靶点。

第五部分:微环境因素诱导肝癌产生多药耐药的胞内信号传导途径

目的:探讨ERK/MAPK信号通路在肝癌多药耐药产生中的作用,以阐明微环境因素诱导肝癌产生多药耐药的胞内信号传导途径。

方法:运用Western-blot技术检测分别在缺氧、低糖环境下生长或稳定整合了HBX基因的HepG2细胞内ERK/MAPK的活性。用ERK/MAPK特异性的阻断剂U0126分别处理这些细胞,RT-PCR技术和Western-blot技术分别检测U0126处理组中HIF-1α和多药耐药相关基因mdr1、LRP、MRP1的mRNA和蛋白水平的表达。免疫细胞化学技术检测U0126处理后这些细胞中HIF-1α表达的定位。

结果:在缺氧、低糖环境下生长或稳定整合了HBX基因的HepG2细胞中磷酸化/非磷酸化的ERK/MAPK比例均有不同程度地增高。用U0126处理细胞12小时后,这些细胞中多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA和蛋白的表达均呈下降趋势,但HIF-1α仅有蛋白表达的减少,其mRNA水平无显著变化。具体数值见文中诸图表。免疫细胞化学染色显示U0126处理后这些细胞中HIF-1α的表达由胞核向胞浆转位。

结论:ERK/MAPK信号通路是微环境因素诱导肝癌产生多药耐药的重要胞内信号传导途径。微环境因素的刺激通过ERK/MAPK传导至细胞内,使HIF-1α蛋白磷酸化并转位至胞核,增强HIF-1α的转录活性,促进多药耐药相关基因的转录及相应药物泵蛋白的合成,从而导致肝癌产生多药耐药的表型。

第六部分:利用siRNA技术分子靶向增强耐药肝癌细胞对化疗药物的敏感性

目的:探讨HIF-1α特异性siRNA对肝癌化疗的增敏作用。

方法:合成具有互补序列的能够编码短发夹RNA(shRNA)的双链寡核苷酸,与pSilencer2.1载体构建成为相应的真核表达质粒,其转录产物可形成特异性针对HIF-1α靶序列的siRNA。经脂质体稳定转染pSilencer2.1/HIF-1α-siRNA质粒于耐药的C28肝癌细胞系。实验分为三组,pSilencer2.1/HIF-1α-siRNA质粒转染的C28细胞为实验组,多药耐药的C28细胞为阴性对照组,用RT-PCR技术和Western-blot技术分别检测三组细胞中多药耐药相关基因mdr1、LRP、MRP1mRNA和蛋白水平的表达,PI法流式细胞术分析三组细胞在受到5-Fu作用后的凋亡指数。每组细胞分别随机注入10只裸鼠,比较三组细胞成瘤后对ADM治疗反应性。

结果:HIF-1α-siRNA能有效地封闭HIF-1α基因、抑制其表达,并能使耐药的C28细胞内多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA和蛋白表达明显下降。在5-Fu作用后的第24h,48h和72h,实验组的AI1分别是阴性对照组的2.88倍,3.56倍和3.87倍,实验组对化疗药物5-Fu的敏感性显著增强(P<0.01)。裸鼠皮下的耐药肝癌瘤体经阿霉素治疗后,实验组的肿瘤明显缩小,肿瘤抑制率为41.35%,与其它两组相比差异显著(P<0.01)。

结论:HIF-1α靶序列特异性的siRNA可增强肝癌细胞对化疗药物的敏感性,它与传统化疗药物的联合应用可望实现对肝癌的有效治疗。

6. 期刊论文 金小顺,耿小平,朱立新 肝癌多药耐药的研究进展 -肝胆外科杂志2007, 15(3)

肝癌为我国最常见的恶性肿瘤之一,化疗是肝癌治疗的一个重要手段,部分病人往往会因肝癌细胞的多药耐药.(multidrug resistance,MDR)而导致化疗无效或逐渐由有效转为无效.故研究肝癌的MDR产生机制对提高肝癌的化疗效果、延长病人的生存期有着重要的意义.本文就新近肝癌MDR相关机制及逆转方法研究中的一些进展作一综述.

7. 学位论文 王新平 单基因转入人肝癌耐药细胞株的建立及RNA干扰靶向MRP1逆转多药耐药的实验研究 2006

背景与目的:肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,其死亡率在消化系统肿瘤中列举第三位,我国每年约有11万人死于肝癌,占全球肝癌死亡数的45%,疗效差、复发率高是死亡率居高不下的主要原因。化疗是目前肝癌治疗和预防复发的主要方法之一,多药耐药现象是肝癌化疗的主要障碍,它是通过多种相关蛋白的过度表达而导致的耐药细胞对多种抗肿瘤药产生抗药性。多药耐药相关蛋白是主要蛋白之一。本实验拟构建多药耐药相关基因(mrp1)真核表达载体pCI-neo-mrp1,将人多药耐药相关蛋白基因转入人肝癌细胞,以使其过度表达多药耐药性蛋白,建立稳定的单因素人肝癌多药耐药细胞株HepG2 / mrp1细胞。观察其生物学特性,再利用RNA干扰技术抑制多药耐药相关蛋白的表达,逆转其多药耐药性,探讨其耐药机理,为进一步研究肝癌多药耐药机制和逆转多药耐药的方法提供理论基础。方法:利用限制性核酸内切酶双酶切合人全长mrp1 cDNA片段的克隆质粒pGEM-mrp1,得到人全长多药耐药相关蛋白基因,并将其定向克隆到哺乳动物真核表达载体pCI-neo的多克隆位点,构建重组表达载体pCI-mrp 1,再将其转入人肝癌细胞株HepG2中,建立转基因人肝癌多药耐药细胞株,经G418筛选,获得稳定表达MRP1的多药耐药细胞株HepG2/mrp1。MTT法检测其对化疗药的敏感性、流式细胞术检测细胞内柔红霉素浓度和多药耐药相关蛋白表达量、RT-PCR半定量检测多药耐药相关蛋白基因mRNA表达量。根据siRNA设计原则,设计并利用体外转录法合成出siRNA片段,采用脂质体转染法转染HepG2/mrp1细胞,检测上述多药耐药指标的逆转情况。

结果:本实验成功的将人多药耐药相关蛋白全长基因克隆入真核表达载体,构建重组表达载体pCI-mrp1,并转染人肝癌细胞株HepG2,建立了稳定表达MRP1的多药耐药细胞系HepG2/mrp1。该细胞系具有明显的多药耐药性,其多药耐药性是亲本细胞的8-11.4倍,细胞内柔红霉素浓度明显降低, mrp1 mRNA及MRP1蛋白表达量明显增加。转染siRNA后,抑制了多药耐药相关蛋白的表达,从而使HepG2/mrp1细胞多药耐药性降低,相对逆转率达90%。说明HepG2/mrp1细胞多药耐药机制主要是由于多药耐药相关蛋白过度表达, RNA干扰技术能够有效地靶向降解mrp1 mRNA的表达,减少MRP1蛋白表达,逆转肝癌的多药耐药。

结论:利用双酶切法获得的mrp1全长基因片段插入真核表达载体能够成功构建重组真核表达载体pCI-neo-mrp1;该载体转染宿主细胞后,能够高效表达有功能的MRP1,使宿主细胞获得MDR表型;利用转基因方法将人mrp1 cDNA导入HepG2细胞,能够建立稳定的肝癌多药耐药细胞株,本方法简单、技术成熟、耗时短、机理单一、耐药性稳定,可以对参与多药耐药的相关基因进一步进行研究。RNA干扰技术是近年来新发现的一种调控基因表达的新技术,能够高效、特异性的逆转MRP1介导的HepG2/mrp1细胞的多药耐药,在研究多药耐药机制和逆转肿瘤多药耐药方面将具有独特的优势。

8. 会议论文 孟晓燕,顾伟,程彬彬,李柏,凌昌全 蟾毒灵对裸鼠移植性人肝癌多药耐药模型的抗肿瘤作用研究 2008

目的:评价蟾毒灵体内对肝癌多药耐药模型的抗肿瘤作用。

方法:建立人肝癌5-氟尿嘧啶获得性多药耐药裸鼠原位移植瘤模型。随机分为生理盐水组,氟尿嘧啶组,蟾毒灵组及蟾毒灵与5-氟尿嘧啶联合用药组。给药14天后,取血检测裸鼠肝肾功能、生化指标;测量肿瘤体积;免疫组化法检测胸苷酸合酶(thymidylate synthase,TS)表达;HE染色对心、肝、肾病理学检查;TUNEL法检测瘤组织凋亡率。

结果:瘤组织耐药蛋白TS呈高水表达;蟾毒灵组及联合治疗组肿瘤体积与生理盐水组比较差异有统计学意义(P<0.05);Tunel法显示,氟尿嘧啶组与生理盐水组凋亡率比较差异无统计学意义(P>0.05),蟾毒灵组及联合用药组凋亡率较生理盐水组升高(P<0.05);蟾毒灵组与生理盐水组肝肾功能、生化指标差异无统计学意义(P>0.05)。

结论：蟾毒灵能抑制裸鼠多药耐药原位移植瘤的生长,增加对化疗药物的敏感性,诱导肿瘤细胞凋亡,且无明显毒副作用。

9. 期刊论文 魏志霞 川芎嗪对肝癌多药耐药株SMMC-7721/ADM的逆转作用 -江苏医药2005, 31 (5)

目的研究川芎嗪对肝癌多药耐药株SMMC-7721/ADM的逆转及其机制。方法用MTT法检测常用化疗药物对SMMC-7721/ADM的毒性。用流式细胞仪(FCM)检测SMMC-7721/ADM细胞表面P-糖蛋白(P-gp)的表达及细胞内柔红霉素的相对浓度。结果川芎嗪可提高SMMC-7721/ADM细胞内化疗药物的浓度,增加阿霉素等化疗药物对SMMC-7721/ADM的毒性作用。结论川芎嗪可逆转人肝癌多药耐药株SMMC-7721/ADM,其机制可能与胞内ADM浓度有关。

10. 学位论文 罗顺峰 低糖微环境对肝癌细胞多药耐药的影响 2006

肝癌细胞是我国最常见的恶性肿瘤之一,目前肝癌的治疗是以手术为主、化疗及其他措施为辅的综合治疗。但肝癌化疗的效果不尽人意,主要原因是肿瘤对多种化疗药物产生了交叉耐药性,即多药耐药(multidrugresistance,MDR)。环境因素对肿瘤的生物性状有着重要影响,本研究拟探讨肝癌生长的低糖微环境与原发性多药耐药的相互关系,分为以下四个部分:

第一部分低糖环境与肝癌多药耐药的产生

目的探讨局部微环境低糖与肝细胞癌多药耐药性产生的关系及影响机制。

方法低糖培养HepG2细胞,应用流式细胞术AnnexinV/PI法检测低糖培养的细胞在化疗药物5-Fu作用后的凋亡情况,分别应用荧光定量PCR技术和Western-blot技术检测低糖培养后HepG2细胞内多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA和蛋白水平的表达。

结果在低糖环境下生长时间越长的HepG2细胞对5-Fu的抵抗越强,而且随着低糖培养时间的增加,5-Fu诱导的HepG2细胞的凋亡高峰延迟。低糖培养的HepG2细胞内多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP在mRNA和蛋白水平的表达随低糖培养时间的延长而升高,以LRP的改变最为显著。

结论肝癌生长微环境葡萄糖耐量不足也是肝癌产生MDR的原因之一。低糖可通过上调一组多药耐药相关基因的表达而诱导肝癌的多药耐药性。

第二部分缺氧诱导因子1α在低糖环境诱导下肝癌多药耐药形成过程中的作用

目的探讨缺氧诱导因子1α(HIF-1α)在低糖环境诱导的肝癌多药耐药(MDR)表型形成过程中的作用和地位,并为预防和逆转肝癌耐药提供有效的新的分子靶点。

方法运用免疫细胞化学技术检测在低糖环境下生长的HepG2细胞内HIF-1α蛋白的表达及定位。应用荧光定量PCR技术和Western-blot技术检测上述条件下HepG2细胞内HIF-1α在mRNA和蛋白水平的表达。转染pcDNA3/HIF-1α质粒于HepG2细胞,检测转染细胞中多药耐药相关基因mdr1、LRP、MRP1的表达。

结果在低糖环境下生长的HepG2细胞中HIF-1α的mRNA和蛋白均不同程度地高表达,并发生了核转位。pcDNA3/HIF-1α质粒转染HepG2细胞中多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA水平较未转染组分别增加了2.4±0.2\*、2.2±0.3#、2.3±0.4#倍

(\*t=3.75,P<0.01;#t=3.42,P<0.01;&t=3.26,P<0.01),它们在蛋白水平的改变与之一致。

结论肝癌生长的微环境可通过核转录因子HIF-1α在转录水平调控多药耐药相关基因的表达,从而诱导肝癌多药耐药表型的形成;HIF-1α的表达上调是微环境诱导肝癌多药耐药形成的中心环节;HIF-1α有望成为预防和逆转肝癌耐药的新的分子靶点。

第三部分ERK通路和低糖环境因素诱导肝癌产生多药耐药的胞内信号传导

目的探讨ERK/MAPK信号通路在肝癌多药耐药产生中的作用,以阐明微环境因素诱导肝癌产生多药耐药的胞内信号传导途径。

方法运用Western-blot技术检测在低糖环境下生长的HepG2细胞内ERK/MAPK的活性。用ERK/MAPK特异性的阻断剂U0126分别处理这些细胞,RT-PCR技术和Western-blot技术分别检测U0126处理组中HIF-1α和多药耐药相关基因mdr1、LRP、MRP1的mRNA和蛋白水平的表达。免疫细胞化学技术检测U0126处理后这些细胞中HIF-1α表达的定位。

结果在低糖环境下生长的HepG2细胞中磷酸化/非磷酸化的ERK/MAPK比例均有不同程度地增高。用U0126处理细胞12小时后,这些细胞中多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA和蛋白的表达均呈下降趋势,但HIF-1α仅有蛋白表达的减少,其mRNA水平无显著变化。具体数值见文中诸图表。免疫细胞化学染色显示U0126处理后这些细胞中HIF-1α的表达由胞核向胞浆转位。

结论ERK/MAPK信号通路是微环境因素诱导肝癌产生多药耐药的重要途径。微环境因素的刺激通过ERK/MAPK传导至细胞内,使HIF-1α蛋白磷酸化并转位至胞核,增强HIF-1α的转录活性,促进多药耐药相关基因的转录及相应药物泵蛋白的合成,从而导致肝癌产生多药耐药的表型。

第四部分利用SiRNA技术分子靶向增强耐药肝癌细胞对化疗药物的敏感性

目的探讨HIF-1α特异性siRNA对肝癌化疗的增敏作用。方法合成具有互补序列的能够编码短发夹RNA(shRNA)的双链寡核苷酸,与pSilencer2.1载体构建成相应的真核表达质粒,其转录产物可形成特异性针对HIF-1α靶序列的siRNA。经脂质体稳定转染PSilencer2.1/HIF-1α-siRNA质粒于耐药的C28肝癌细胞系。实验分为三组,PSilencer2.1/HIF-1α-siRNA质粒转染的C28细胞为实验组,PSilencer2.1空载体转染的C28细胞为阴性对照组,C28细胞为空白对照组。用RT-PCR技术和Western-blot技术分别检测三组细胞中多药耐药相关基因mdr1、LRP、MRP1mRNA和蛋白水平的表达,PI流式细胞术分析三组细胞在受到5-Fu作用后的凋亡指数。每组细胞分别随机注入10只裸鼠,比较三组细胞成瘤后对ADM治疗反应性。

结果HIF-1α-siRNA能有效地封闭HIF-1α基因、抑制其表达,并能使耐药的C28细胞内多药耐药相关基因mdr1、MRP1、LRP的mRNA和蛋白表达明显下降。在5-Fu作用后的第24h,48h和72h,实验组的AI分别是阴性对照组的2.88倍,3.56倍和3.87倍,实验组对化疗药物5-Fu的敏感性显著增强(P<0.01)。裸鼠皮下的耐药肝癌瘤体经阿霉素治疗后,实验组的肿瘤明显缩小,肿瘤抑制率为41.35%,与其它两组相比差异显著(P<0.01)。

结论HIF-1α靶序列特异性的siRNA可增强肝癌细胞对化疗药物的敏感性,它与传统化疗药物的联合应用可望实现对肝癌的有效治疗。

引证文献(2条)

1. 陈晟, 邓钢, 牛焕章, 何仕诚, 方文, 汪盛齐, 马占龙, 郭金和, 李国昭, 滕皋军 兔VX2肝种植肿瘤模型制作的完善及综合影像学评价[期刊论文]-介入放射学杂志 2007(1)
2. 王晓东, 杨仁杰, 张宏志, 孙宏亮 兔肝血管影像解剖、变异和肝动脉插管方法的初步探讨[期刊论文]-介入放射学杂志 2006(12)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfjsxzz200404023.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfjsxzz200404023.aspx)  
授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: cb17dd29-f8cf-4fd7-b7cb-9e2b00b179cc

下载时间: 2010年11月11日