

杨晓华,郭莉莉,路丽明. 耐紫杉醇肺原位小鼠移植瘤模型的建立和鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 275-283.
Yang XH, Guo LL, Lu LM. Establishment and characterization of a xenotransplant paclitaxel-resistant model of human lung cancer cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 275-283.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.001

耐紫杉醇肺原位小鼠移植瘤模型的建立和鉴定

杨晓华^{1#}, 郭莉莉^{1#}, 路丽明^{1,2*}

(1. 上海市胸科医院, 上海交通大学附属胸科医院, 实验中心, 上海 200030; 2. 上海市免疫学研究所, 上海交通大学医学院, 上海 200025)

【摘要】 目的 建立肺原位移植耐紫杉醇肿瘤动物模型以及耐药机制的研究。**方法** 利用本实验室已经获得的耐紫杉醇肺癌细胞株(A549-Taxol), 测定其耐药指数和细胞对抗癌药物的敏感性后, 采用穿刺法将约为每毫升 5×10^6 细胞注入小鼠肺部, 3周后统计存活率以及成瘤率并且观察小鼠状态。RT-PCR 和 Western Blot 技术检测肿瘤中耐药基因 GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 的 mRNA 和蛋白质的表达情况。**结果** A549-Taxol 肺癌细胞的耐药指数为 508 倍; GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 耐药蛋白表达明显升高 ($P < 0.001$), 且 A549-Taxol 组肺癌细胞的侵袭能力显著高于 A549 组。用 5×10^6 细胞量进针 5 mm 的注射入肺部的存活率与成瘤率分别为 100% 和 85%, 成瘤后免疫组化显示耐药蛋白在 A549-Taxol 组裸鼠中明显表达, 且耐药蛋白高于 A549 裸鼠组。**结论** GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 的表达与肺癌紫杉醇耐药相关, 初步建立了耐紫杉醇的肺癌原位动物模型, 耐药细胞对紫杉醇的耐药性保持稳定并可用于后续的实验研究。

【关键词】 肺癌; 裸鼠; 原位移植瘤模型; 紫杉醇耐药

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 03-0275-09

Establishment and characterization of a xenotransplant paclitaxel-resistant model of human lung cancer cells

YANG Xiaohua^{1#}, GUO Lili^{1#}, LU Liming^{1,2*}

(1. Central Laboratory, Shanghai Chest Hospital, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200030, China.
2. Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025)

Corresponding author: Lu Liming. E-mail: LuLunew2003@163.com

【Abstract】 Objective To establish xenotransplant paclitaxel-resistant models with A549 human lung cancer cells for the detection of drug resistance. **Methods** A549-taxol cells (5×10^6 /mL) were injected into the lungs of nude mice. After 3 weeks, survival and tumor growth were recorded. MTT assays were performed to identify the drug-resistant index and drug susceptibility. Real-time PCR and western blotting were undertaken to detect Pgp170 and MMP-7 mRNA and protein expression, respectively. **Results** GST- π , P-gp170, and MMP-7 expression were significantly increased ($P < 0.001$), and the invasiveness of GST- π -treated A549-taxol lung cancer cells was significantly higher than that of untreated A549-taxol cells and the A549-control group. The survival rate and tumor formation of A549-taxol cells were 100% and 85%,

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81671579, 82071856), 上海市科学技术委员会实验动物研究项目(18140903800), 上海交通大学转化医学协同创新中心合作资助项目(TM201522, TM201721), 上海交通大学附属胸科医院协调创新项目(YJXT20190106), 国家重点 R&D 项目重点专项(2017YFA0104600)。

Funded by National Natural Science Foundation Project(81671579, 82071856), Shanghai Science and Technology Commission Experimental Animal Research Project(18140903800), Shanghai Transportation Collaborative Self-help Project of Collaborative Innovation Center of University Translational Medicine(TM201522, TM201721), Shanghai Jiaotong University Affiliated Chest Hospital Major Project(YJXT20190106), National Key R&D Program Key Special Project(2017YFA0104600)。

【作者简介】 杨晓华(1984—), 男, 中级技师, 研究方向: 肺癌发病机制及药物研究。Email: yxh111000@126.com;
郭莉莉(1990—), 女, 技师, 研究方向: 肺癌细胞培养及分子生物学研究。Email: glth123@163.com。
#共同第一作者

【通信作者】 路丽明(1976—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤免疫研究。Email: lulunew2003@163.com

respectively. Immunohistochemistry showed that the drug resistance protein was significantly expressed in the A549-taxol group, and was higher than that in A549-control nude mice. **Conclusions** GST- π , P-gp170, and MMP-7 expression was associated with paclitaxel resistance in lung cancer. Lung orthotopic transplantation has been gradually established, and the current animal model of paclitaxel-resistant lung cancer remained stable, indicating its usefulness for future experiments.

[Keywords] lung cancer; nude mouse; xenograft tumor; paclitaxel-resistant

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺癌临床表现复杂症状隐蔽,难于早期发现,所以肺癌后期的化疗成为了肺癌治疗的主要方法。然而化疗耐药性,尤其是多药耐药(multidrug resistance, MDR),成为了肿瘤化疗失败的重要原因^[1-3]。之前对MDR进行研究,多采用体外细胞系的方法。由于体外细胞系无法模拟与MDR具有密切关系的动物内环境和免疫系统,因而建立了耐药细胞株动物模型,如肺癌耐药A549/DDP动物模型^[4],耐紫杉醇(Taxol)肺癌细胞动物模型^[5]。

以往建立的动物模型均采用皮下成瘤的方法,这种方法具有成瘤率高、耐药性好、肿瘤遗传特性稳定等优点。但由于皮下异位使肿瘤并不处于肺部原位组织,因而不具有肺癌肿瘤细胞的生长环境和生物学特性,也很难模拟出肺癌肿瘤的临床表征^[6-7]。将耐药肺癌细胞移植到肺部原位处能够很好的模拟肺癌肿瘤的内部生长环境,保留其在体内原位处的生理特性。这种动物模型可实现对肺癌肿瘤细胞的“全真模拟”,对MDR机制的深入研究,抗癌药物的研发及逆转MDR药物的筛选都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40只4~6周龄SPF级雄性裸鼠,每组20只,分别为A549组和A549-Taxol组。体重16g左右,购自上海杰思捷实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0004】,按照SPF级动物饲养标准在上海市胸科医院【SYXK(沪)2018-0016】进行饲养。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,室温(23±2)℃,裸鼠分笼饲养,自由饮水、摄食。实验过程中对动物的处置符合2006年9月科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》,所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审查号:KS2028)

1.1.2 细胞

人肺腺癌细胞(A549)由本室常规传代培养,耐

紫杉醇人肺腺细胞株(A549-Taxol)由本实验室建立^[8],培养于10%灭活胚胎牛血清的高糖DMEM培养液,并在含有浓度5%的CO₂,37℃的培养箱中培养。细胞传代使用0.25%的胰蛋白酶处理。

1.1.3 主要试剂与仪器

胚胎牛血清(BSA)和高糖DMEM培养基均购自Gibco公司;胰蛋白酶,四甲基偶氮唑盐(MTT),二甲基亚砜(DMSO)均购自Sigma公司;谷胱甘肽S-转移酶(GST- π)抗体,糖蛋白(P-gp170)抗体和基质金属蛋白酶(MMP-7)抗体,均购自北京中山生物科技有限公司;带U6启动子的过表达质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro(带阴性质粒)和PLVX-shRNA-GFP购自ADDGENE公司pCDH(Promega, Madison, WI)。

超净工作台(Thermo, 美国);全自动酶标仪(Biotek, 美国);CO₂培养箱(Thermo, 美国);离心机(Thermo, 美国);倒置相差显微镜(Leica, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠肺部原位移植瘤模型的建立

原位移植瘤模型的建立主要采用穿刺法,将裸鼠用0.05g/mL氯胺酮按每只0.1mL腹腔麻醉后,右侧卧位固定。分别向小鼠肺部注入肿瘤细胞悬液。取不同量的原代培养的A549和A549-Taxol细胞用胰蛋白酶消化处理成悬液,并与一定体积的matrigel混合至终体积3mL,使用灭菌针头将每个具有一定细胞数量的混合液,沿小鼠左肩胛第5肋间缓慢进针约5mm后向肺内注射细胞液,每只实验裸鼠接种细胞数约每毫升 5×10^6 ,稍作停留后抽出针头。注射完毕松开实验裸鼠,观察至其恢复正常呼吸后放回饲养笼饲养,以防实验意外^[9]。A549组和A549-Taxol组小鼠各20只。

1.2.2 实验裸鼠状态观察及体重测量

接种肿瘤细胞后每日观察A549组和A549-Taxol组实验裸鼠临床症状,每周2次称量并记录其体重,绘制体重变化曲线。

1.2.3 细胞耐药性测定

小鼠皮下成瘤 3 代后,将成肿瘤小鼠处死,在无菌条件下分离肿瘤组织,并用筛网制备单细胞悬液,然后采用 MTT 法测定耐药性。将细胞以每毫升 3×10^4 个接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL 。Taxol 用培养液稀释成终浓度为 20、40、80、160、320、640 递增至 20 480 $\mu\text{g/L}$,每一浓度重复 3 孔,同时,使用 100 μL 培养液作为对照。培养 48 h 后,每孔加入 20 μL 5 g/L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 DMSO,震荡混匀后,在 540 nm 下测定各孔光密度值,计算 50% 细胞抑制所需的药物浓度 (IC_{50}),并根据公式计算耐药指数:耐药指数 = 耐药细胞 IC_{50} /亲代细胞 IC_{50} 。

1.2.4 P-gp170 干扰和过表达载体构建

根据 P-gp170 mRNA 选择目标序列按 shRNA 的设计原则设计多聚核苷酸序列保留 BamHI 或 XbaI 的酶切位点并确定其为特异性序列。正义、反义序列分别为 5'-CCUGGACAAUGACAAGUACAUTTT-3' 和 5'-AUGUACUUGUCAUUGUCCACCTT-3'。

两条寡核苷酸链经过混合、变性、退火形成双链寡核苷酸。载体经过酶切成线性,将退火的寡核苷酸连接到载体后、转化、摇菌、铺平板挑选单克隆进行细菌扩增,最后利用质粒小抽试剂盒获得干扰载体。过表达载体是基于 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro 骨架构建的,首先根据 NCBI 找到 P-gp170 基因编码序列,然后 PCR 扩增序列,通过酶切酶连的方法连接目标序列和质粒骨架,再通过转化扩增及质粒小抽试剂盒,获得过表达载体。最后,上述的干扰载体和过表达载体都经过细胞转染,进行载体验证和后续实验。

1.2.5 RT-PCR

用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,在 MMLV 逆转录酶的作用下合成 cDNA,然后以此为模板进行 PCR,比较 GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 基因的表达情况。目的基因 GST- π :上游引物 5'-CCCTACACCG TGGTCTATTTCC-3',下游引物 5'-CAGGAGGCTTT GAGTGAGC-3';目的基因 MMP-7:上游引物 5'-GAGTGAGCTACAGTGGGAACA-3',下游引物 5'-CTATGACGCGGGAGTTTAACAT-3';目的基因 P-gp170:上游引物 5'-GGGAGCTTAACACCCGACTTA-3',下游引物 5'-GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT-3';内参基因 GAPDH:上游引物 5'-TCACCATC TTCCAGGAGCG-3',下游引物 5'-AGTGAGCTT CCCGTTTACA-3';扩增后 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,

凝胶成像扫描系统扫描分析。

1.2.6 Western Blot

预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入 150 μL 上样缓冲液 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min,短暂离心,800 rpm LDS-PAGE 电泳,每孔上样 60 μL 。样品分离后转移至硝酸纤维素 (NC) 膜 (转印缓冲液含 20 mmol/L Tris, 200 mmol/L 甘氨酸,200 mmol/L 甲醇)。转印后 NC 膜室温干燥于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。检测前将 NC 膜置于含 50 mL/L 牛血清白蛋白的 TBST 缓冲液中室温封闭 1 h,分别加入羊抗人多克隆抗体 GST- π 、P-gp170、MMP-7 (4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜) 和 GAPDH (室温孵育 2 h),TBST 再次漂洗,然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (抗羊、抗鼠) 室温孵育 2 h, TBST 漂洗后 DAB 显色,凝胶成像扫描系统扫描分析。

1.2.7 免疫组化和切片

标本经 4 μm 连续切片,分别做 HE 和免疫组化染色。免疫组化染色采用两步法 (EnVisionTM)。具体如下:切片脱蜡至水,尿素消化,3% 过氧化氢封闭,用柠檬酸缓冲液进行微波修复,冷却,10% 羊血清封闭,加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;从冰箱取出 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温,用自来水冲洗抗体,加入抗兔二抗 (EnVision) 和抗鼠二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 (中间各步用 PBS 洗),加 DAB 显色,在显微镜观察终止显色。用苏木素轻微复染,脱水透明封片,在光镜下观察,对照组设阳性、阴性和空白对照。

1.2.8 双免疫荧光

加 P-gp170 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜等步骤同上,第 2 天复温后加 FITC 标记的山羊抗兔抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 40 min, PBS 洗;加 V-ATPase 鼠抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS 洗,加 TRITC 标记的红色抗鼠荧光抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 40 min, PBS 洗,甘油封片,激光共聚焦镜观察、照相。

1.2.9 细胞划痕实验和迁移实验

将 A549-Taxol 耐药细胞与 A549 细胞分别接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,进行划线。分别拍照记录划线后 0、24、48 h 的细胞划痕的宽度。细胞迁移实验利用了 Transwell 小室,将两种细胞悬液加入 Transwell 小室中,待 24 h 和 48 h 后,用结晶紫染色拍照。

1.3 统计学分析

本文的实验数据均用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并用 GraphPad Prism 软件处理,两组组间比较使用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

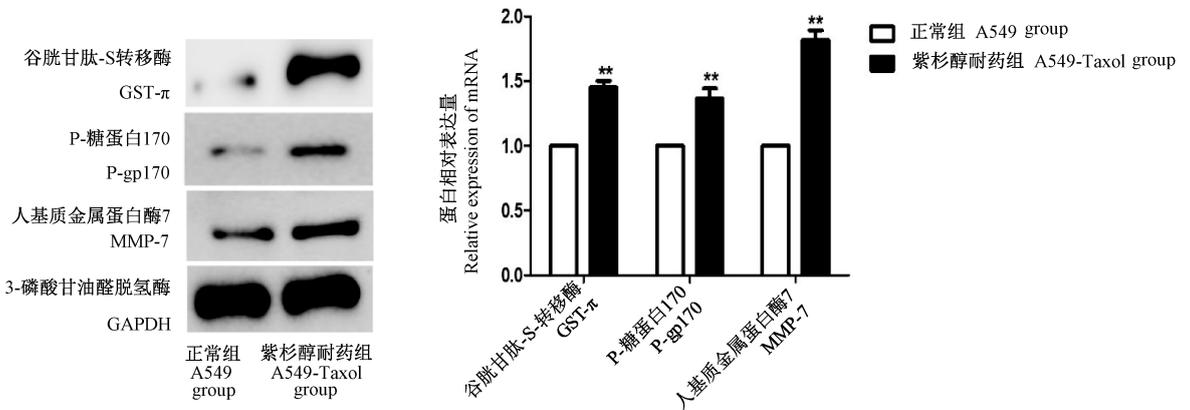
2.1 细胞耐药性测定

A549-Taxol 耐药细胞经 BNX 小鼠皮下传代 3 代,增强其成瘤性后,检测 A549-Taxol 细胞 IC_{50} 为 $(6349 \pm 0.87) \mu\text{g/L}$,而亲代 A549 细胞 IC_{50} 为 $(12.5 \pm 0.42) \mu\text{g/L}$,A549-Taxol 细胞耐药指数是亲代细胞的 508。

2.2 耐药基因表达情况

为了探讨紫杉醇耐药细胞的耐药机制,通过比较紫杉醇耐药细胞和 A549 细胞中耐药蛋白 GST- π ^[10-11]、P-gp170^[12-13] 和 MMP-7^[14] 的表达。RT-PCR 和 Western Blot 结果显示:GST- π 和 P-gp170 在耐药细胞株中表达显著高于正常组 A549 肺癌细

胞($P < 0.001$)(图 1),免疫荧光结果也显示耐药细胞株的耐药蛋白表达明显升高(图 2)。研究报道紫杉醇是 p-糖蛋白的潜在底物,p-糖蛋白的高表达可抑制药物吸收从而导致耐药^[12-13]。此外,GST- π 的异常表达也与肿瘤对化疗药物耐药的发生发展有关,紫杉醇也可能作为 GST- π 的底物通过催化偶联反应直接代谢^[10-11]。因此,结果说明紫杉醇耐药细胞可能通过高表达 GST- π 和 p-gp170 阻碍紫杉醇吸收从而产生耐药。另一方面,研究发现耐药细胞株中 MMP-7 的表达量也显著性高于正常组 A549 细胞(图 1),细胞划痕实验(图 3A)和侵袭实验(图 3B)显示紫杉醇耐药细胞株也有更强的迁移和侵袭能力。这说明紫杉醇耐药株细胞可能通过增加细胞迁移和侵袭能力起到耐药的作用。



注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 耐药和正常 A549 细胞内耐药蛋白的表达情况

Note. Compared with A549, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Expression of drug-resistant protein in Taxol and normal A549 cells

2.3 P-gp170 耐药基因的验证

为了进一步的验证耐药基因与紫杉醇耐药之间的直接关系,以 P-gp170 为例,构建了 p-gp170 的过表达细胞株和沉默表达的细胞株。经过细胞转染后验证的结果得出:过表达 P-gp170 后,P-gp170 基因明显高表达。干扰 shRNAP-gp170 后,P-gp170 基因极显著低表达。图 4 结果发现,A549-Taxol 耐药细胞转染载体后,组别为耐药株、干扰空载、干扰 shRNA P-gp170、过表达空载、过表达 PCDH p-gp 组,对应的 IC_{50} 依次为 $(6349 \pm 0.87) \mu\text{g/L}$ 、 $(6544 \pm 42) \mu\text{g/L}$ 、 $(3256 \pm 56) \mu\text{g/L}$ 、 $(6233 \pm 61) \mu\text{g/L}$ 、 $(8649 \pm 122) \mu\text{g/L}$ 。其中,干扰 shRNA P-gp170 组相对于耐药组 IC_{50} 降低 2 倍左右,明显不耐药。而过表达 PCDH p-gp 组相对于耐药组 IC_{50} 增加 1.4 倍左右,耐药程度增加。结果说明 p-gp170 的表达与

紫杉醇耐药直接相关,可能是通过阻碍紫杉醇吸收导致细胞耐药。

2.4 A549-Taxol 裸鼠生长情况

结果发现,紫杉醇耐药细胞株的建立提供了一种研究模型,可以在体外研究紫杉醇耐药机制。但是对于临床研究来说,体外实验不能很好的反应真实情况,因此需要建立小鼠模型。为了更贴近患者实际情况,本研究采用了原位移植的方法,将小鼠左肩胛第 5 肋间作为进针位点,注射肿瘤细胞(图 5 A)。原位移植裸鼠后 1 ~ 1.5 周,A549 和 A549-Taxol 组小鼠体重未见明显变化;1.5 ~ 2.5 周,两组小鼠体重急剧上升;第 2.5 周开始,A549 和 A549-Taxol 组小鼠弓背明显;腹部逐渐出现膨隆,体重有所下降,A549-Taxol 组小鼠症状较为严重,两组小鼠体重变化曲线(图 5B)。

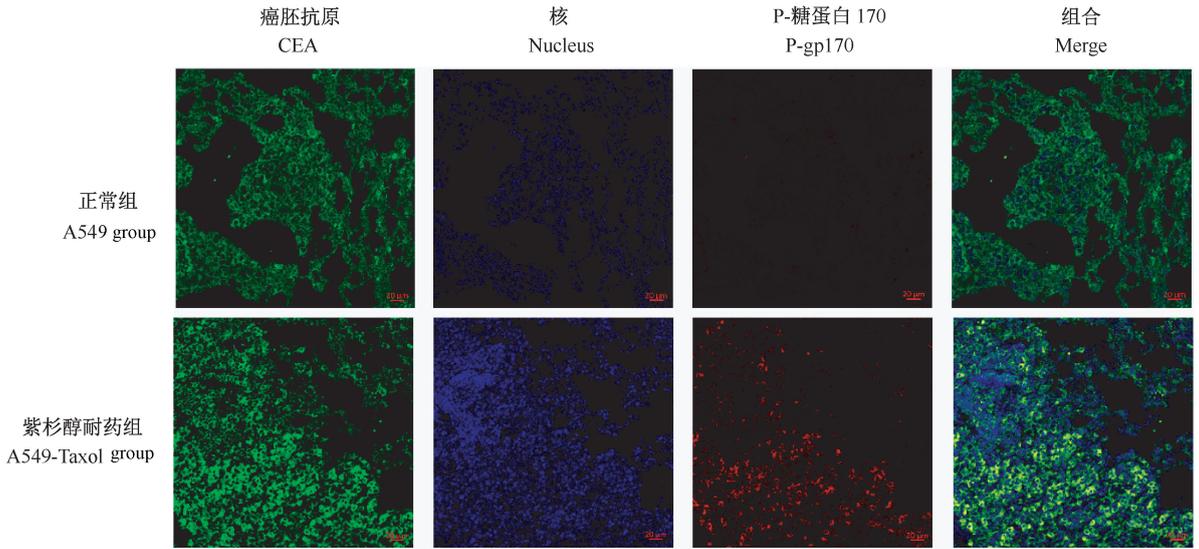
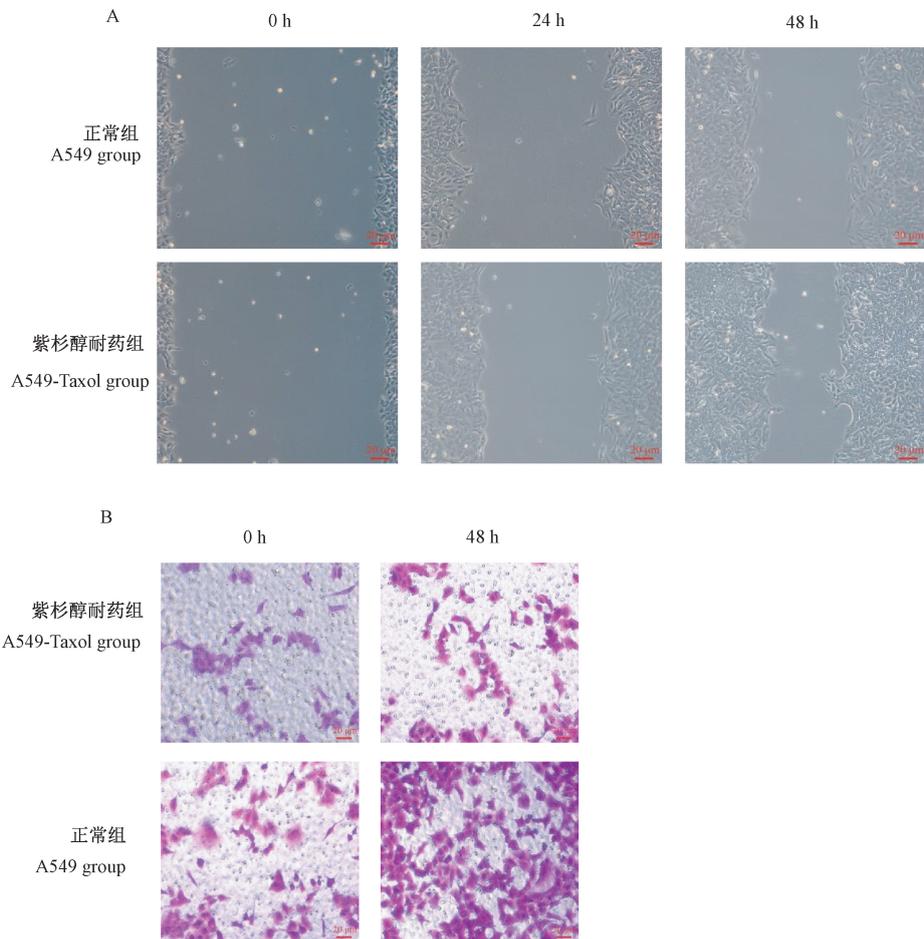


图 2 耐药蛋白 P-gp170 在耐药和正常 A549 细胞内的表达情况

Figure 2 Expression of drug-resistant protein P-gp170 in Taxol and normal A549 cells

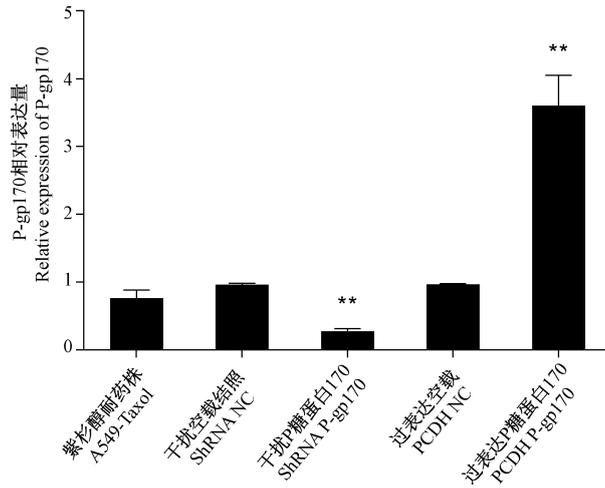


注:A:划痕实验;B:迁移实验。

图 3 紫杉醇耐药细胞和正常 A549 细胞的迁移情况

Note. A. Woundhealing test. B. Transwell test.

Figure 3 Migration capacity of Taxol and normal A549 cells

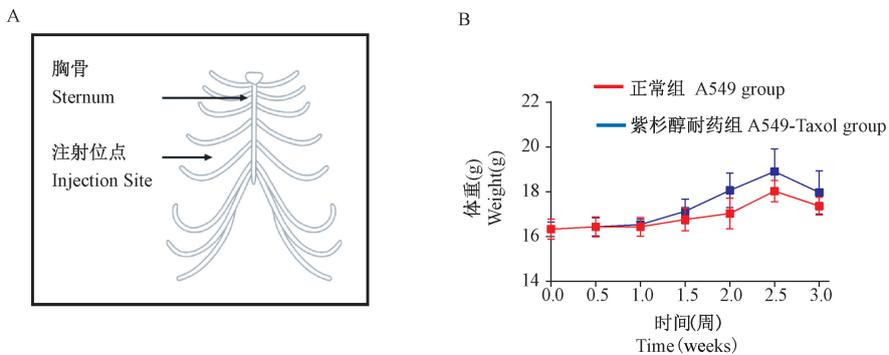


注:与耐药株相比, ** $P < 0.01$ 。

图 4 A549 细胞中耐药蛋白 p-gp170 的表达情况

Note. Compared with Taxol resistant strains, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Expression of drug-resistant protein p-gp170 of A549 cells



注:A:肿瘤原位移植模型;B:小鼠体重变化。

图 5 肺癌原位移植模型图与小鼠体重变化

Note. A. Model of tumor implantation. B. Change of body weight.

Figure 5 Orthotopic lung cancer model and the change of body weight

2.5 成瘤率、肺部组织形态及 HE 染色观察

饲养 3 周后,统计两组裸鼠的成瘤率,A549 组和 A549-Taxol 组的成瘤率分别为 80% 和 85%,图 6A 和图 6B 为 A549 组和 A549-Taxol 组裸鼠的肺部组织形态,可见已有团块肿瘤组织生长。图 6C 和图 6D 为两组小鼠 HE 染色图片,可见团块肿瘤组织周围肺组织及细支气管受压,病灶内有血管穿行。肿瘤细胞呈圆形、椭圆形或梭形,胞浆稀少,核大且圆,核浆比增加,可见病理性核分裂,病灶内肿瘤细胞呈巢团状排列。

2.6 肿瘤组织中耐药蛋白表达

免疫组化显示 GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 在 A549-Taxol 组裸鼠中明显表达(图 7),PCR 和 Western Blot 定量分析耐药的表达结果显示 GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 在 A549-Taxol 组裸鼠肿瘤组织

中表达明显升高(图 8)。

综上所述,GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 与肺癌紫杉醇耐药相关,通过对肺癌紫杉醇耐药细胞的研究发现,P-gp170 可能通过阻碍紫杉醇吸收导致细胞耐药,此外紫杉醇耐药细胞通过提高 MMP-7 的表达量增加侵袭性,也间接导致细胞耐药。为了更贴近临床实际情况,研究人员采用 5×10^6 细胞量、进针 5 mm 的注射法建立了耐紫杉醇肺癌细胞肺部原位移植动物模型,通过实验证明了此动物模型的稳定性,可用于多种实验研究。

3 讨论

肺癌成为肿瘤死因的首位,2012 年公布的数据显示肺癌患者的 5 年生存率仅为 10% ~ 15%^[15],肺癌化疗的多药耐药(MDR)成为肿瘤治疗的主要

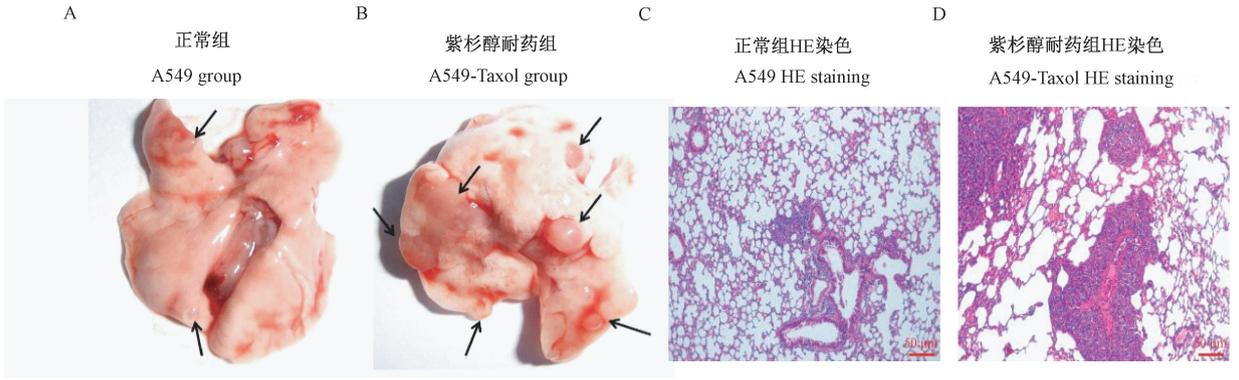


图 6 小鼠原位成瘤
Figure 6 Orthotopic tumor of mice

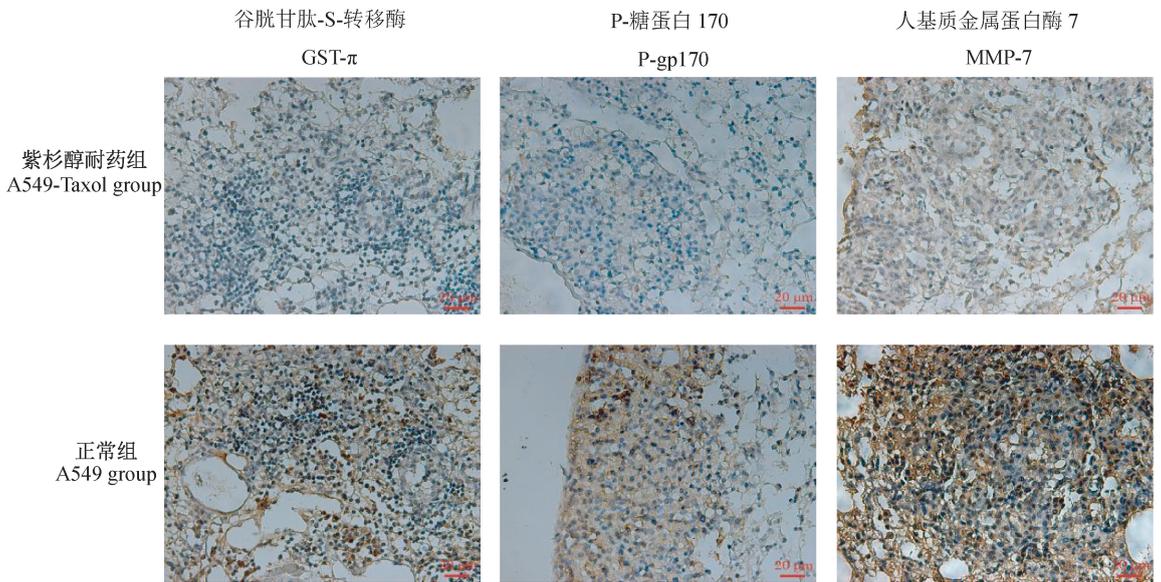


图 7 肿瘤组织内耐药蛋白的表达情况
Figure 7 Expression of drug resistant protein in tumor tissues

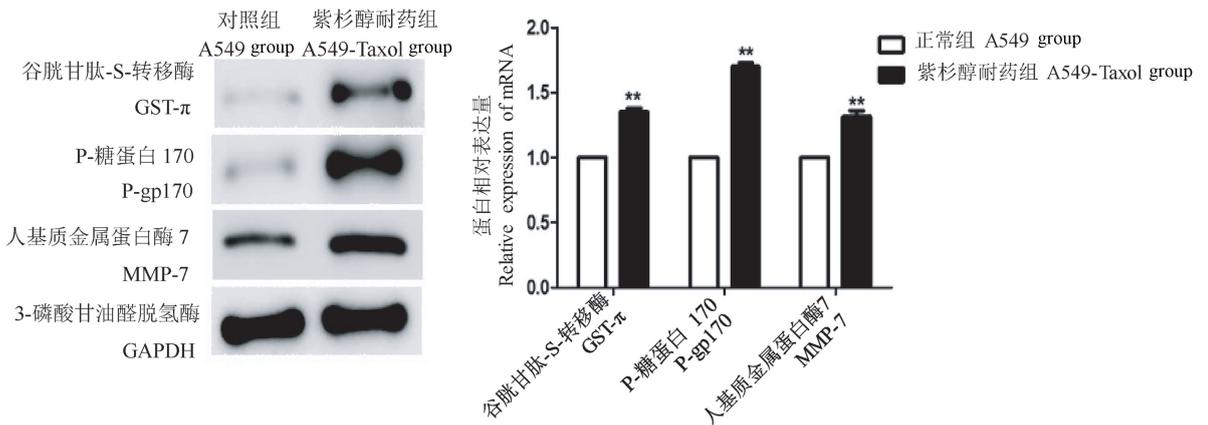


图 8 肿瘤组织内耐药蛋白的表达情况
Figure 8 Expression of drug resistant protein in tumor tissues

阻碍。因此,深入了解肺癌 MDR 的机制,对于开发抗肿瘤药物、提高肿瘤化疗成功率具有重要意义。近年来国内外已经建立了多种多耐药细胞株,在体外对 MDR 进行研究发现生物膜表面蛋白基因过量表达产生的 P-gp170,细胞内还原型谷胱甘肽 GSH 和 GST- π 及肺耐药蛋白等都与 MDR 有着密切关系^[16-17]。但是体外与体内实验仍存在一定差异,因而建立肿瘤耐药模型显得尤为必要。

目前已成功建立了肝癌、胃癌、胶质瘤等肿瘤多药耐药动物模型^[18-20],但肺癌耐药动物模型报道并不多,实体瘤耐药移植模型多采用皮下移植和原位移植两种途径。然非原位移植的皮下瘤与在肺部原位处的肿瘤之间生物学特性相差很大,因此借助于非原位移植皮下瘤模型的研究结果,与实际临床效果之间必然具有某些不同。所以原位移植瘤模型的建立就显得尤为重要,因为这种模型能够更加接近癌症患者体内的真实情况,更好地模拟人晚期肺癌的特征,更好地应用于临床诊断治疗和 MDR 机制的研究。如果临床上想要利用消融手术治疗耐药性肺癌,可以利用本研究建立的肺癌原位移植耐药肿瘤模型进行消融研究,给临床治疗提供有效的建议。

紫杉醇与长春新碱、长春花碱、多柔比星等有交叉耐药现象^[21-22]。本实验室已成功建立 A549-Taxol 细胞株,其耐药指数为 512 倍,此次研究中采用此细胞株进行裸鼠皮下成瘤,然后将注射后的小鼠进行 SPF 级饲养,进而采用免疫印迹、免疫染色等手段对小鼠体内的成瘤细胞进行相关生物学特性测定。结果表明注入细胞量为每毫升 5×10^6 ,进针深度为 5 mm 时,成瘤率为 85%,耐药指数为 508 倍,从而初步建立了一个耐紫杉醇肺癌细胞肺部原位移植动物模型。

本研究基本建立耐紫杉醇肺原位移植瘤模型,此肺癌模型将可以更好地模拟肺癌病人耐药后肿瘤的生长、浸润、转移等临床特征,为开发筛选有效逆转肿瘤多药耐药的新一代药物及深入探索肿瘤耐药机制奠定基础。

参 考 文 献(References)

[1] 黄程辉,曹培国,谢兆霞. MCF-7/Adr 细胞 mdr-1 基因启动子甲基化和组蛋白乙酰化状态与多药耐药的关系 [J]. 中南大学学报(医学版), 2009, 34(5): 369-374.
Huang CH, Cao PG, Xie ZX. Relation of promoter methylation of mdr-1 gene and histone acetylation status with multidrug resistance in MCF-7/Adr cells [J]. J Cent South Univ (Med

Sci), 2009, 34(5): 369-374.
[2] Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer [J]. Chin J Cancer, 2017, 6(1): 52.
[3] Amiri KL, Basseville A, Kurdziel K, et al. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies [J]. Drug Resist Updat, 2012, 15(1-2): 50-61.
[4] 陶黎阳,黎浙英. 肺癌 A549 耐药裸鼠移植瘤模型的建立 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(7): 5, 14.
Tao LY, Li JY. Establishment of a multidrug resistance human lung cancer A549 cells nude mice xenograft [J]. Guide Chin Med, 2011, 9(7): 5, 14.
[5] 沙慧芳,孙强玲,杨晓华. 耐紫杉醇肺癌细胞 BNX 动物模型的建立 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(12): 1296-1299.
Sha HF, Sun QL, Yang XH. Establishing a paclitaxel-resistant BNX mouse model of human lung cancer [J]. Acad J Second Military Med Univ, 2011, 32(12): 1296-1299.
[6] 张玉侠,曹广文,温宗梅,等. 两种方法建立人肾透明细胞癌裸鼠原位移植转移模型及其比较 [J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(5): 399-402.
Zhang YX, Cao GW, Wen ZM, et al. Orthotopic-transplant metastatic model of human renal clear cell carcinoma in nude mice: histologically intact tissue implantation compared to cell-suspension injection [J]. Acta Univ Med Anhui, 2005, 40(5): 399-402.
[7] 陈远卓,郑军华,刘敏,等. CO₂ 气腹对人肾癌裸鼠原位移植瘤中 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响 [J]. 同济大学学报(医学版), 2012, 33(6): 72-75.
Chen YZ, Zheng JH, Liu M, et al. Effects of CO₂ pneumoperitoneum on expression of HIF-1 α and VEGF in orthotopically transplanted human renal carcinoma in nude mice [J]. J Tongji Univ (Med Sci), 2012, 33(6): 72-75.
[8] 杨晓华,沙慧芳,冯久贤,等. 人肺腺癌紫杉醇耐药细胞株的建立及其特性研究 [J]. 现代医学, 2009, 37(1): 34-37.
Yang XH, Sha HF, Feng JX, et al. Establishment and characterization of a Taxol induced drug-resistant human lung adenocarcinoma cell subline [J]. Mod Med J, 2009, 37(1): 34-37.
[9] 陈炜旋,刘东明,张志坚,等. 人小细胞肺癌原位移植瘤裸鼠模型的构建 [J]. 实用放射学杂志, 2010, 26(6): 883-886.
Chen WN, Liu DM, Zhang ZJ, et al. The establishment of xenotransplantation models with human small cell lung cancer in nude mice [J]. J Pract Radiol, 2010, 26(6): 883-886.
[10] Li J, Ye T, Liu Y, et al. Transcriptional activation of Gstp1 by MEK/ERK signaling confers chemo-resistance to cisplatin in lung cancer stem cells [J]. Front Oncol, 2019, 9: 476.
[11] Dong SC, Sha HH, Xu XY, et al. Glutathione S-transferase π : a potential role in antitumor therapy [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 3535-3547.
[12] Baek JS, Cho CW. A multifunctional lipid nanoparticle for co-delivery of paclitaxel and curcumin for targeted delivery and

- enhanced cytotoxicity in multidrug resistant breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 2, 8(18): 30369–30382.
- [13] Guo W, Dong W, Li M, et al. Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3881–3891.
- [14] He W, Zhang H, Wang Y, et al. CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (NSCLC) invasion through upregulating MMP-7/MMP-9 [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 400.
- [15] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9–29.
- [16] Jabr-Milane LS, van Vlerken LE, Yadav S, et al. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance [J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(7): 592–602.
- [17] Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(6): 505–520.
- [18] 葛文刚, 张长和, 孙倍成. 裸鼠人肝癌移植瘤耐药模型的建立 [J]. *江苏医药*, 2010, 36(24): 2939–2942.
Ge WG, Zhang CH, Sun BC. Establishment of nude mice model with human hepatocellular carcinoma multidrug resistance xenografts [J]. *Jiangsu Med J*, 2010, 36(24): 2939–2942.
- [19] 韩宇, 陈孝平. 建立一种新的多药耐药的诱导方法 [J]. *中德临床肿瘤学杂志(英文版)*, 2005, 4(2): 86–88.
- Han Y, Chen XP. Establishment of a *mdr1* multidrug resistant model of orthotopic transplantation of liver carcinoma on nude mice [J]. *Chin-Germ J Clin Oncol*, 2005, 4(2): 86–88.
- [20] 王攀, 魏寿江, 何一, 等. 人胃癌 SGC-7901/HCPT 裸鼠移植瘤的建立及生物学特性研究 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2010, 17(11): 1147–1151.
Wang P, Wei SJ, He Y, et al. Establishment and characterization of human gastric cancer cell line SGC-7901/HCPT xenograft in nude mice [J]. *Chin J Bas Clin Gen Surg*, 2010, 17(11): 1147–1151.
- [21] 安青, 章永红, 刘旭, 等. 紫杉醇作用于肺癌 A549 细胞核转录因子荧光素酶值变化的意义 [J]. *南京中医药大学学报*, 2011, 27(3): 254–256.
An Q, Zhang YH, Liu X, et al. Paclitaxel's effect on lung cancer A549 cells and its changes on luciferase value of nuclear transcription factors [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2011, 27(3): 254–256.
- [22] 吴芳红. 紫杉醇治疗肺癌的不良反应分析 [J]. *中国医药*, 2010, 5(5): 433–434.
Wu FH. Analysis of side effects caused by sciadopitysin on treatment of lung cancer [J]. *Chin Med*, 2010, 5(5): 433–434.

[收稿日期] 2020-06-16