

# 顺铂耐药性肺癌荷瘤裸鼠模型的建立与评价

李志明<sup>1</sup>, 王芬<sup>2</sup>, 李仝<sup>1</sup>, 范毅南<sup>3</sup>, 张怡雯<sup>1</sup>, 陈泽慧<sup>4\*</sup>

(1.北京中医药大学第三附属医院肿瘤血液科,北京 100029;2.Silver Bamboo Health Science LLC,Fairfax 22030;  
3.北京朝阳中西医结合急诊抢救医院妇科,北京 100022;4.中国中医科学院中医药信息研究所,北京 100700)

**[摘要]** **目的** 建立顺铂耐药性肺癌荷瘤裸鼠模型,并对造模效果进行评价。**方法** 体外培养人肺腺癌 A549 细胞与人肺腺癌顺铂耐药型 A549 细胞(A549/DDP),接种细胞悬液于裸鼠背部皮下,构建肺癌荷瘤裸鼠模型。分离瘤体细胞,进行原代培养。选择顺铂溶液为实验用药,按照浓度梯度(0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 与 64 mg/L)依次设立 10 个组别,分别对 A549 及 A549/DDP 细胞进行干预。采用四甲基偶氮唑盐法检测 3 个时间节点(24 h、48 h 与 72 h)下的 OD 值,计算细胞抑制率;获得顺铂的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>),确定耐药倍数,验证肺癌模型是否具备顺铂耐药性质。**结果** ①随着时间、浓度的增加,顺铂对 A549/DDP 细胞的抑制率逐渐升高,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。②随着时间、浓度的增加,顺铂对 A549 细胞的抑制率逐渐升高,组间、时点间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );且组间与时点间存在交互作用( $P < 0.05$ )。③在相同时间、相同浓度下,顺铂对 A549 细胞的抑制率明显高于 A549/DDP 细胞;且组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。④随着时间的增加,顺铂对 A549、A549/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 值均逐渐降低,组间、时点间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );且组间与时点间存在交互作用( $P < 0.05$ )。⑤干预 24 h、48 h 与 72 h 下,获得的耐药倍数分别为 $12.395 \pm 1.209$ 、 $29.043 \pm 2.178$ 、 $16.902 \pm 0.727$ ;组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。均提示细胞高度耐药,其中,48 h 耐药性质最佳。**结论** 通过皮下接种 A549/DDP 细胞悬液,可成功构建顺铂耐药性质的肺癌荷瘤裸鼠模型。该模型可为进一步研究耐药发生与演变的生物学机制提供良好的载体。

**[关键词]** 肺肿瘤;顺铂;抗药性;肿瘤 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.05.008

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)05-0539-09

## Establishment and evaluation of a nude mouse model of cisplatin-resistant lung cancer

LI Zhi-ming<sup>1</sup>, WANG Fen<sup>2</sup>, LI Tong<sup>1</sup>, FAN Yi-nan<sup>3</sup>, ZHANG Yi-wen<sup>1</sup>, CHEN Ze-hui<sup>4\*</sup>

(1.Department of Oncology and Hematology, the Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2.Silver Bamboo Health Science LLC, Fairfax 22030, USA; 3.Department of Gynaecology, Emergency Rescue Hospital, Beijing Chaoyang Hospital of Integrated TCM and Western Medicine, Beijing 100022, China; 4.Institute of Information on Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a nude mouse model of cisplatin-resistant lung cancer and to evaluate the modeling effect. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 cells and human lung adenocarcinoma cisplatin-resistant A549 cells (A549/DDP) were cultured in vitro,

[收稿日期]2024-09-19

[基金项目]国家自然科学基金项目(81973783);北京中医药大学新教师启动基金项目(2022-JYB-XJSJJ-087)

[作者简介]李志明(1991-),男,山西忻州人,北京中医药大学第三附属医院主治医师,医学博士,从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。

\* 通信作者。E-mail:chenzh@mail.cintem.ac.cn

and cell suspensions were inoculated subcutaneously on the back of nude mice to construct a tumor-bearing nude mouse model of lung cancer. Tumor cells were separated and primary culture was performed. Cisplatin solution was selected as the experimental drug, and 10 groups were set up according to concentration gradients (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, and 64 mg/L) to intervene in A549 and A549/DDP cells, respectively. MTT assay was used to detect OD values at three time points (24 h, 48 h, and 72 h), to calculate cell inhibition rate. The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of cisplatin was obtained, to determine the multiples of drug resistance, and to verify whether the lung cancer model had cisplatin resistance properties. **Results**

① With the increase of time and concentration, the inhibition rate of cisplatin on A549/DDP cells gradually increased, showing significant difference of interaction between groups, time points and time points between groups ( $P < 0.05$ ). ② With the increase of time and concentration, the inhibition rate of cisplatin on A549 cells gradually increased, showing significant difference of interaction between groups and between time points ( $P < 0.05$ ); there was an interaction between groups and time points ( $P < 0.05$ ). ③ At the same time and concentration, the inhibitory rate of cisplatin on A549 cells was significantly higher than that on A549/DDP cells, showing significant difference between groups ( $P < 0.05$ ). ④ With the increase of time, the  $IC_{50}$  of cisplatin on A549 and A549/DDP cells gradually decreased, showing significant difference of interaction between groups and between time points ( $P < 0.05$ ); there was an interaction between groups and time points ( $P < 0.05$ ). ⑤ The multiples of drug resistance obtained after intervention for 24 h, 48 h, and 72 h were  $12.395 \pm 1.209$ ,  $29.043 \pm 2.178$ , and  $16.902 \pm 0.727$ , respectively; There was a significant difference between the groups ( $P < 0.05$ ). All indicated a high degree of drug resistance of cells, with the optimal resistance observed at 48 h. **Conclusion** A nude mouse model of cisplatin-resistant lung cancer can be successfully constructed by subcutaneous inoculation of A549/DDP cell suspension. This model can provide a good carrier for further studying the biological mechanisms of occurrence and evolution of drug resistance.

**[Key words]** lung neoplasms; cisplatin; drug resistance, neoplasm

肿瘤的多药耐药 (multidrug resistance, MDR), 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时, 会对其他结构不同、作用机制相异的多种抗肿瘤药物也产生交叉耐药的广谱耐药现象<sup>[1-2]</sup>。该现象由 Biedler 等<sup>[3]</sup>于 1970 年首次发现; 根据耐药性与抗肿瘤治疗的关系, 分为原发性耐药与获得性耐药两大类; 其中, 获得性耐药临床较为多见, 指由化疗药物诱导产生的耐药性, 是导致抗肿瘤治疗失败的主要原因<sup>[4]</sup>。医学界对肿瘤多药耐药的发生机制进行了深入探索, 临床各医家从不同角度给出相关阐释<sup>[5-6]</sup>; 但肿瘤 MDR 的发生机制是复杂的, 目前尚未达成明确的共识。在 MDR 相关性研究中, 构建模拟临床耐药的动物模型是科研实验的关键环节; 然而, 当前耐药模型的构建方法尚不成熟, 造模准确率及效率偏低, 成为困扰科研进展的核心问题。基于此, 本研究拟开展肺癌耐药模型的实验研究, 旨在探索造模条件, 探究造模方法。针对肺腺

癌, 当前国际推荐的标准一线治疗方案是以铂类药物为基础的化疗, 铂类药物首选顺铂<sup>[7-8]</sup>。因此, 本研究拟以顺铂耐药为研究靶点, 选择具有顺铂耐药特性的肺癌 A549 细胞(A549/DDP), 通过细胞悬液法制备肺癌荷瘤裸鼠模型。采用肿瘤原代细胞培养及四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)实验方法, 计算细胞抑制率, 确定耐药倍数, 鉴定耐药性质, 最终评价具有顺铂耐药性质的 A549/DDP 荷瘤裸鼠模型的建立效果; 为未来开展 MDR 深入实验研究提供前提保证。

## 1 材料与 方法

1.1 材料 实验动物: SPF 级 6 周龄雄性 BALB/C 裸鼠 6 只, 体重 16~18 g; 由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。实验动物许可证号: SCXK(京)2019-0010; 质量合格证编号: 110324201104388258。动物实验室由天津创科生物科技有限公司提供。实

验细胞:人肺腺癌 A549 细胞株,由中国医学科学院基础研究所提供。人肺腺癌耐顺铂 A549 细胞株(A549/DDP),由中国医学科学院协和医学院细胞库提供。

**1.2 实验试剂** 实验用药:注射用顺铂(冻干型;10 mg/支;0F0104B02);购于齐鲁制药有限公司。主要试剂:RPMI-1640 培养基(Roswell Park Memorial Institute-1640)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)、青霉素/链霉素溶液购于 Corning-Cellgro 公司。0.25% EDTA 胰蛋白酶购于 INVITROGEN 公司。二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)购于美国 Mediatech 公司。四甲基偶氮唑盐购于北京百瑞极生物科技有限公司。实验试剂配置,①细胞培养液:胎牛血清(占 10%)与青霉素/链霉素溶液(占 1%)加入 RPMI-1640 培养基。②细胞冻存液:DMSO、胎牛血清与 RPMI-1640 培养基按照 1:2:7 的配伍比例混合;现用现配。③ MTT 液:避光称量 MTT 药粉 25 mg,5 mL PBS 溶液充分溶解、混合均匀,制备成浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液。④化疗药:依据顺铂在人体的血浆高峰浓度 2.0 mg/L<sup>[9]</sup>,依次配置不同浓度梯度的实验用药:0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 与 64 mg/L;0.9%生理盐水溶解冻干粉,RPMI-1640 培养基稀释至所需浓度。

**1.3 实验仪器** CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购于美国 ThermoForma 公司。超净工作台购于苏州净化设备有限公司。酶标仪购于瑞士 Tecan 公司。倒置显微镜购于日本 Nikon 公司。T25 细胞培养瓶、96 孔板购于 Corning-Cellgro 公司。精密天平购于上海精天电子仪器有限公司。低速离心机购于北京医用离心机厂。水浴锅购于北京市永光明医疗仪器厂。高压消毒锅购于日本 TOMY SX-500 公司。离心管、冻存管购于 NUNC 公司。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 细胞培养方法

**1.4.1.1 细胞复苏** 液氮罐中取出冻存细胞株,37 °C 恒温水浴锅融化解冻。移液器吸取细胞悬液,移入离心管离心(1 000 r/min,5 min)。弃上清液,加入适量细胞培养液混匀后,将细胞悬液移入细胞培养瓶中。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

**1.4.1.2 细胞换液** 吸出旧培养液,用 PBS 溶液冲洗 2 次后,加入新的细胞培养液,放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中继续培养。定时观察细胞生

长状态,待细胞布满培养瓶底部的 80% 以上时,提示细胞处于对数生长期,可以进行传代。换液隔日进行。

**1.4.1.3 细胞传代** 吸出旧培养液,PBS 溶液反复冲洗。加入解冻后的 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid),细胞培养箱静置 1 min。显微镜下观察,当细胞团缩、脱落、间隙增大时,加入细胞培养液终止消化。滴管扇形吹打,移至离心管离心。弃上清,加入细胞培养液,充分混匀后移至细胞培养瓶。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

**1.4.1.4 细胞冻存** 吸出旧培养液,PBS 溶液冲洗。0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液充分消化,待细胞团缩脱落后,终止消化。离心管离心,弃上清。加入细胞冻存液充分混匀,分装至冻存管中。密封、标记冻存管,于 4 °C 冰箱中放置 30 min,-20 °C 冰箱中放置 2 h,-80 °C 冰箱中放置过夜。液氮罐保存备用<sup>[10]</sup>。

**1.4.1.5 A549/DDP 细胞耐药性的维持** 将初始浓度为 0.5 mg/L 的顺铂溶液加入细胞培养液中,以维持 A549/DDP 细胞对顺铂的耐药性,防止反复增殖、传代使耐药性减弱或消失。在细胞培养过程中,逐渐增加顺铂给药浓度,以终浓度为 2 mg/L 维持培养。在正式实验前 1 周停止给药。

### 1.4.2 裸鼠造模方法

**1.4.2.1 构建裸鼠移植瘤模型** 参照潘雄飞<sup>[11]</sup> 的实验方法,通过细胞悬液法构建皮下移植瘤裸鼠模型。取对数生长期的 A549 及 A549/DDP 细胞,制备成细胞悬液,浓度调整至  $1 \times 10^7$  /mL。取 BALB/C 裸鼠 6 只,3 只接种 A549 细胞悬液,另 3 只接种 A549/DDP 细胞悬液。注射器抽取细胞悬液,排空空气,注射于裸鼠右侧背部靠近腋窝处;每只裸鼠皮下注射约 0.2 mL。接种完毕后,SPF 级环境下常规饲养,定时观察裸鼠生长及成瘤情况。饲养约 1 周左右,当注射部位皮下可触及绿豆粒大小的硬结时,提示移植瘤接种成功。继续饲养 2 周左右,待瘤体长至小指甲盖大小时,准备取材。

**1.4.2.2 肿瘤原代细胞培养** 将荷瘤裸鼠模型脱颈椎处死,75%酒精浸泡消毒 5 min。消毒完毕,移至超净工作台;用无菌剪刀切开皮肤,镊子移除血管、脂肪等,剥离出新鲜的肿瘤组织;用 PBS 溶液反复冲洗数次。用无菌剪刀将瘤体组织剪碎至 1~2 mm<sup>3</sup> 的小块,加入 0.25% 胰蛋白酶消化 20~30 min,细胞培养液终止消化。用滴管吹散细胞团;经 100 目过滤筛过滤,离心机离心。弃上清,

加入细胞培养液充分混匀,经滴管吹打形成细胞悬液;分装至细胞培养瓶中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。定时换液、传代,扩增细胞数,方法如前述。

### 1.4.3 MTT 法检测肿瘤原代细胞的耐药性

1.4.3.1 细胞分组 设立3个组别:空白组、对照组与实验组。空白组仅予细胞培养液;对照组予A549或A549/DDP细胞+细胞培养液;实验组在对照组基础之上,予不同浓度的顺铂溶液。分别设立10个顺铂药物浓度组,依次为0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32与64 mg/L。并设立3个检测时间节点,依次为24 h、48 h与72 h。见表1。

表1 A549/DDP与A549细胞分组情况

Table 1 Grouping of A549/DDP and A549 cells

组别	培养液	细胞悬液	顺铂溶液 (mg/L)
空白组	细胞培养液	无	0
对照组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	0
实验组			
0.125组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	0.125
0.25组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	0.25
0.5组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	0.5
1组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	1
2组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	2
4组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	4
8组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	8
16组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	16
32组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	32
64组	细胞培养液	A549/DDP或A549细胞悬液	64

1.4.3.2 MTT 实验 取生长状态良好且处于对数生长期的细胞,0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液消化,加入细胞培养液,配置成细胞悬液,调整细胞悬液浓度为5×10<sup>4</sup>个/mL。96孔板上分别设立空白组、对照组及实验组(实验组根据药物浓度再分为10个亚组,因组别较多,同时铺2张板),各组及各亚组分别设立5个复孔。按照每孔200 μL,将细胞悬液分别加入对照组及实验组中;空白组不加细胞悬液,只加等量的细胞培养液。96孔板边缘每孔加入200 μL的PBS溶液封边。37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育24 h。显微镜下观察细胞的生长情况,待细胞状态良好,吸出旧培养液,空白组与对照组分别加入等量的细胞培养液,实验组的每个亚组则按照既定浓度分别加入含相应浓度的顺铂溶液的细胞培养液,继续孵育。选择孵育24 h、48 h与72 h为检测

的时间点。检测前4 h,每孔避光加入制备好的MTT溶液20 μL,继续培养4 h至时间节点。检测前,小心吸净各孔内的培养液,每孔加入150 μL的DMSO。置于摇床上震荡10 min,使蓝紫色结晶物甲瓩充分溶解。在酶标仪490 nm波长下,检测各孔的吸光度(optical density, OD)值<sup>[12]</sup>。MTT实验重复进行3次。

1.4.3.3 指标检测 汇总5个复孔的OD值,求取平均值,即获得各组及各亚组的最终OD值。计算不同顺铂给药浓度下的细胞抑制率<sup>[13]</sup>,具体公式如下:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$$

$$\text{细胞抑制率} = 1 - \text{细胞存活率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$$

半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>),指细胞抑制率为50%时的给药浓度,即能使存活的细胞数减少一半时所需要的药物浓度。汇总各浓度下的细胞抑制率,通过SPSS25.0 统计分析软件,计算半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值<sup>[14-15]</sup>。并计算获得耐药倍数<sup>[16]</sup>,具体公式如下:

$$\text{耐药倍数} = \frac{\text{A549/DDP 细胞的 IC}_{50} \text{ 值}}{\text{A549 细胞的 IC}_{50} \text{ 值}}$$

1.5 统计学方法 应用SPSS 25.0 统计软件分析数据。计量资料采用t 检验、单因素方差分析、SNK-q 检验及重复测量的方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 裸鼠成瘤情况 图1A为采用细胞悬液法,造模获得的A549/DDP肺癌荷瘤裸鼠模型。图1B为荷瘤裸鼠模型处死后,解剖获得的新鲜瘤体组。

2.2 顺铂对A549/DDP的抑制作用 随着干预时间的增加,顺铂对A549/DDP细胞的抑制率逐渐升高,随着给药浓度的增加,顺铂对A549/DDP细胞的抑制率亦逐渐升高,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异均有统计学意义(P<0.05),见表2、图2。

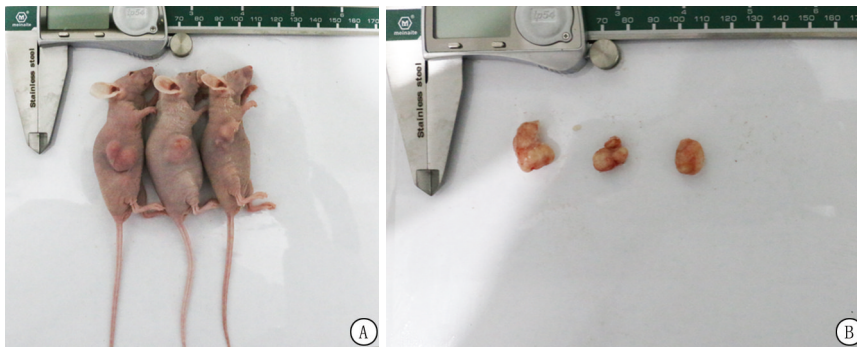


图1 A549/DDP肺癌荷瘤裸鼠模型及瘤体组织

A. A549/DDP肺癌荷瘤裸鼠模型图; B. 荷瘤裸鼠模型处死后, 解剖获得的新鲜瘤体

Figure 1 A549/DDP lung cancer nude mouse model and tumor tissue

表2 顺铂对A549/DDP细胞的抑制率

Table 2 Inhibition rate of cisplatin on A549/DDP cells

(n=3,  $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别(mg/L)	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
0.125 组	2.900±0.002	3.800±0.005	4.800±0.003
0.25 组	6.200±0.005	7.900±0.003	13.900±0.001
0.5 组	9.500±0.006	12.300±0.002	17.900±0.006
1 组	15.100±0.002	15.900±0.003	23.700±0.004
2 组	18.400±0.006	22.200±0.001	28.400±0.001
4 组	23.200±0.002	27.700±0.002	32.100±0.004
8 组	31.300±0.005	36.300±0.002	37.600±0.005
16 组	36.000±0.005	40.100±0.004	54.500±0.021
32 组	42.500±0.013	54.300±0.016	67.000±0.003
64 组	53.500±0.014	64.900±0.002	80.900±0.001
组间	F 值=16 059.413		P 值<0.001
时点间	F 值=1 982.550		P 值<0.001
组间·时点间	F 值=116.525		P 值<0.001

表3 顺铂对A549细胞的抑制率

Table 3 Inhibition rate of cisplatin on A549 cells

(n=3,  $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别(mg/L)	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
0.125 组	16.700±0.009	17.000±0.024	22.900±0.010
0.25 组	29.000±0.007	32.700±0.021	36.500±0.002
0.5 组	34.500±0.011	44.900±0.006	47.600±0.005
1 组	41.500±0.013	59.100±0.013	63.100±0.010
2 组	44.300±0.002	66.000±0.011	69.500±0.008
4 组	50.400±0.008	76.300±0.023	80.200±0.022
8 组	54.000±0.012	79.600±0.010	83.100±0.021
16 组	58.100±0.006	84.000±0.012	89.700±0.041
32 组	64.000±0.008	86.100±0.002	91.600±0.039
64 组	77.600±0.010	90.700±0.010	97.200±0.036
组间	F 值=1 458.395		P 值<0.001
时点间	F 值=2 100.438		P 值<0.001
组间·时点间	F 值=70.662		P 值<0.001

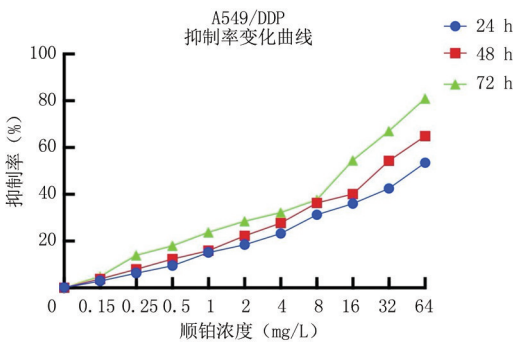


图2 顺铂对A549/DDP的抑制率曲线图

Figure 2 Inhibition rate curve of cisplatin on A549/DDP

2.3 顺铂对A549的抑制作用 随着干预时间的增加, 顺铂对A549细胞的抑制率逐渐升高, 随着给药浓度的增加, 顺铂对A549细胞的抑制率亦逐渐升高。组间、时点间、组间·时点间交互作用差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表3、图3。

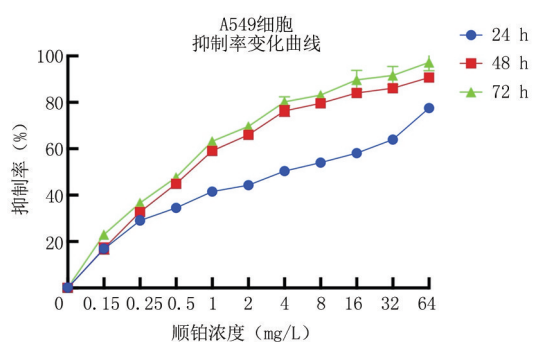


图3 顺铂对A549的抑制率曲线图

Figure 3 Inhibition rate curve of cisplatin on A549

2.4 顺铂对A549、A549/DDP的抑制作用 在相同干预时间、相同给药浓度下, 顺铂对A549细胞的抑制率明显高于A549/DDP细胞; 且组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 见表4~6、图4~6。

表4 顺铂干预24 h对A549及A549/DDP细胞的抑制率

Table 4 Inhibition rate of 24-hour cisplatin intervention on A549 and A549/DDP cells

(n=3,  $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	0.125组	0.25组	0.5组	1组	2组
A549	16.700±0.009	29.000±0.007	34.500±0.011	41.500±0.013	44.300±0.002
A549/DDP	2.900±0.002	6.200±0.005	9.500±0.006	15.100±0.002	18.400±0.006
t值	25.251	46.573	34.703	34.306	78.181
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
时间	4组	8组	16组	32组	64组
A549	50.400±0.008	54.000±0.012	58.100±0.006	64.000±0.008	77.600±0.010
A549/DDP	23.200±0.002	31.300±0.005	36.000±0.005	42.500±0.013	53.500±0.014
t值	58.885	30.910	50.687	23.934	23.994
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表5 顺铂干预48 h对A549及A549/DDP细胞的抑制率

Table 5 Inhibition rate of 48-hour cisplatin intervention on A549 and A549/DDP cells

(n=3,  $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	0.125组	0.25组	0.5组	1组	2组
A549	17.000±0.024	32.700±0.021	44.900±0.006	59.100±0.013	66.000±0.011
A549/DDP	3.800±0.005	7.900±0.003	12.300±0.002	15.900±0.003	22.200±0.001
t值	9.232	20.550	92.728	56.084	68.932
P值	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
时间	4组	8组	16组	32组	64组
A549	76.300±0.023	79.600±0.010	84.000±0.012	86.100±0.002	90.700±0.010
A549/DDP	27.700±0.002	36.300±0.002	40.100±0.004	54.300±0.016	64.900±0.002
t值	36.159	74.382	60.596	33.535	43.731
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表6 顺铂干预72 h对A549及A549/DDP细胞的抑制率

Table 6 Inhibition rate of 72-hour cisplatin intervention on A549 and A549/DDP cells

(n=3,  $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	0.125组	0.25组	0.5组	1组	2组
A549	22.900±0.010	36.500±0.002	47.600±0.005	63.100±0.010	69.500±0.008
A549/DDP	4.800±0.003	13.900±0.001	17.900±0.006	23.700±0.004	28.400±0.001
t值	31.405	152.965	69.495	65.598	89.282
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
时间	4组	8组	16组	32组	64组
A549	80.200±0.022	83.100±0.021	89.700±0.041	91.600±0.039	97.200±0.036
A549/DDP	32.100±0.004	37.600±0.005	54.500±0.021	67.000±0.003	80.900±0.001
t值	36.935	36.497	13.144	10.843	7.775
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001

24 h抑制率变化曲线

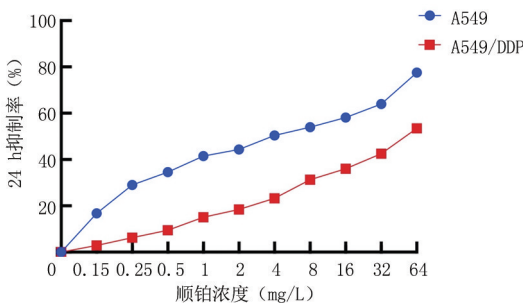


图4 顺铂干预24 h对2组细胞的抑制率曲线图

Figure 4 Inhibition rate curve of cisplatin intervention on two groups of cells for 24 h

48 h抑制率变化曲线

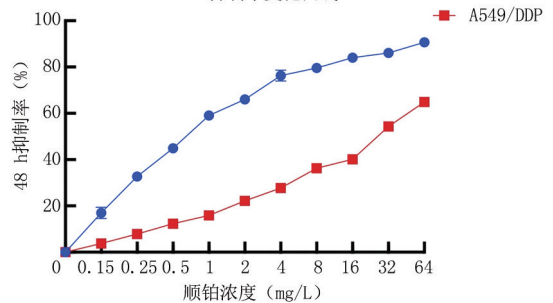


图5 顺铂干预48 h对2组细胞的抑制率曲线图

Figure 5 Inhibition rate curve of cisplatin intervention on two groups of cells for 48 h

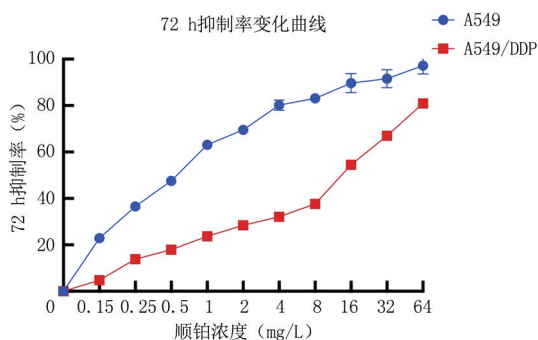


图6 顺铂干预72 h对2组细胞的抑制率曲线图

Figure 6 Inhibition rate curve of cisplatin intervention on two groups of cells for 72 h

2.5 顺铂的  $IC_{50}$  值 随着干预时间的增加,顺铂对A549、A549/DDP细胞的  $IC_{50}$  值均逐渐降低。组间、时点间、组间·时点间交互作用差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表7。

表7 顺铂对A549、A549/DDP的  $IC_{50}$  值Table 7  $IC_{50}$  values of cisplatin on A549 and A549/DDP(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

$IC_{50}$ 值	24 h	48 h	72 h
A549	4.108±0.367	0.830±0.085	0.595±0.028
A549/DDP	50.623±0.679	24.001±0.948	10.052±0.313
组间	F 值=15 869.944		P 值<0.001
时点间	F 值=2 518.336		P 值<0.001
组间·时点间	F 值=1 745.803		P 值<0.001

2.6 耐药倍数 不同干预时间下获得的顺铂耐药倍数,48 h的耐药倍数最高;且组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表8。

表8 顺铂对A549、A549/DDP的耐药倍数比较

Table 8 Comparison of drug resistance multiples of cisplatin to A549 and A549/DDP

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

干预时间	耐药倍数
24 h	12.395±1.209
48 h	29.043±2.178*
72 h	16.902±0.727*#
F 值	99.122
P 值	<0.001

\* P 值<0.05 与 24 h 比较 # P 值<0.05 与 48 h 比较(SNK-q 检验)

### 3 讨论

3.1 MTT 法研究结果评价 MTT 法是用于检测细胞增殖、生长情况的经典方法;通过测定用药干预后细胞的存活率,来鉴定药物对细胞的毒性反应<sup>[17-18]</sup>。MTT 法具有操作简单便捷、敏感稳定、无放射性污染等特点,已成为细胞生物学领域的常用科研方法<sup>[19]</sup>。本研究即选用 MTT 法测定顺铂干

预下 A549 及 A549/DDP 细胞的存活率,进而鉴定顺铂的细胞毒性效应。根据 MTT 最终实验结果,3 个干预时间点的耐药倍数分别为:12.395±1.209、29.043±2.178、16.902±0.727,均提示细胞高度耐药;证实耐药模型构建成功。

查阅相关文献,有学者应用 MTT 法检测 48 h 的 A549/DDP 耐顺铂性质,提示耐药倍数为 13.08<sup>[20]</sup>;亦有学者开展相同实验研究,得出 48 h 的耐药倍数为 12.51<sup>[21]</sup>;两者的实验结果均与本研究 24 h 获得的耐药倍数相近,均在 12.395±1.209 范围之内。另有学者延长顺铂给药时间至 72 h,得出 A549/DDP 耐药倍数为 16.8<sup>[22]</sup>;该结果与本研究 72 h 获得的耐药倍数相近。尽管不同学者开展的实验研究存在客观差异性,但我们通过直观的数据对比,均支持本研究的 A549/DDP 细胞在不同干预时段(24 h/48 h/72 h)具有耐顺铂性质;因 48 h 耐药倍数最高,故以 48 h 的耐药性质为最佳。

探究 48 h 耐药倍数高于 72 h 的原因:耐药倍数与 2 组细胞的  $IC_{50}$  值相关;A549/DDP 在 48 h 时的  $IC_{50}$  值明显高于 72 h,而 A549 细胞 48 h 的  $IC_{50}$  值与 72 h 相当。该结果对细胞耐药相关研究有如下启示:A549/DDP 细胞的耐药峰值可能为 48 h,或者 48~72 h,需要后续实验进一步证实。

3.2 耐药模型的建立方法思考 通过本研究结果,可得出如下结论:具有顺铂耐药性质的肺癌荷瘤裸鼠模型构建成功。在模型构建过程中,本实验选择数种研究方法,包括细胞悬液法、肿瘤原代细胞培养法等;重新对实验方法进行思考,总结优缺点,反思缺陷与不足,对未来开展相关实验研究具有重要意义。

3.2.1 肺癌动物模型的建立方法 肺癌动物模型可分为肺癌预防模型与肺癌治疗模型两大类;前者用于肺癌的化学预防,根据实验动物的不同,又可分为小鼠肺癌预防模型、大鼠肺癌预防模型及树鼯肺癌预防模型<sup>[23]</sup>。肺癌治疗模型是肿瘤相关的在体实验常涉及的模型类别,根据接种部位、转移部位及肿瘤细胞的不同,可分为诸多类型<sup>[24]</sup>。如按照接种部位的不同,分为肺癌原位模型、皮下移植瘤模型及腹腔相关模型;按照转移部位的不同,分为肺癌骨转移模型和胸膜转移模型;按照肿瘤细胞来源的不同,分为移植性、自发性、诱发性及动物基因修饰模型等<sup>[23,25-26]</sup>。

构建皮下移植瘤肺癌治疗模型是本实验应用的研究方法;因移植瘤位于小鼠浅表皮下,易于直观监测成瘤情况;且方便测量瘤体体积及动态观察成瘤

趋势,有助于鉴定造模成功率及宏观评估药物干预疗效。基于以上优点,本实验选择构建肺癌皮下移植瘤模型为实验模型。肺癌皮下移植瘤的造模方法相对成熟,常见的方法有细胞悬液法与肿瘤组织块移植法两类<sup>[23,27]</sup>。细胞悬液法即将肿瘤细胞制备成适当浓度的细胞悬液后,直接进行皮下接种的方法;Jakubowska等<sup>[28]</sup>选择小鼠腋窝皮下注射肺癌细胞悬液,成功建立了肺癌荷瘤模型。本实验选择裸鼠右侧背部靠近腋窝处注射肺癌 A549 及 A549/DDP 细胞悬液,成功构建了肺癌荷瘤裸鼠模型。肺癌皮下移植瘤的造模方法操作相对简单,且成瘤率较高;故皮下移植瘤模型成为目前应用最广泛的模型构建方法,为大多数实验所青睐<sup>[29]</sup>。

然而,不可否认的是,皮下移植瘤模型亦存在诸多缺陷。肺癌移植瘤毕竟有别于原位肺癌,移植瘤的肿瘤微环境与原位肺癌存在较大差异性,故给药干预后的反馈信息亦有不同;通过实验获得的模型鼠生存时间及抑瘤疗效亦存在较大差别。故临床前通过皮下移植瘤模型评估抗肿瘤药物的疗效时,实验结论与临床实际干预疗效存在一定偏差。由此我们可以获得如下实验经验:在今后的肺癌相关基础实验中,如具备构建原位肺癌模型的实验条件,则优先选择原位肺癌模型,使获得的实验证据更加客观准确,更加接近于临床实际。

**3.2.2 肿瘤原代细胞培养** 原代细胞培养是指从有机体直接分离获得组织,用物理或化学的方法将组织分散形成细胞,再进行体外原代培养的方法<sup>[30]</sup>。由原代细胞产生的可进行多次传代的细胞群,称为细胞系。因原代细胞起源于有机体,且离体时间短,遗传、组织及生物学特性均与机体相似,可很大程度保留在体的功能状态<sup>[31-32]</sup>。而经反复传代的细胞系,因受环境的长期影响,其生物学特性已与原代细胞有诸多不同。故本实验选择荷瘤裸鼠的原代细胞进行培养;因其可准确反应裸鼠的本质特征,故通过鉴定原代细胞的顺铂耐药性,可客观反应荷瘤裸鼠的耐药性质。

常用的原代细胞培养方法包括组织块培养法、酶消化法及裸鼠皮下肿瘤包埋法<sup>[33-34]</sup>。组织块培养法操作步骤简单便捷,是较常见的原代细胞培养方法<sup>[35]</sup>;但实验过程容易损伤细胞,导致原代细胞的存活率不高<sup>[36]</sup>。裸鼠皮下肿瘤包埋法具有较高的细胞培养存活率与成瘤效率,且能较好地复制肿瘤在体环境,使细胞的生物学特性得到更好保存;但该法实验要求较高,操作较为复杂<sup>[37]</sup>。酶消化法是通过消化酶对肿瘤组织进行消化,过滤、离心

后获得原代细胞的方法;该法操作相对简单,成功获取原代细胞的效率较高;且实验易于开展,实验成本相对较低<sup>[38]</sup>。本研究即选择酶消化法进行 A549 及 A549/DDP 细胞的原代提取,均成功获得了原代细胞并顺利完成培养及后续的 MTT 实验。

通过酶消化法提取肿瘤组织的原代细胞,我们对处理组织有如下经验总结,①高效快速:组织剪碎应尽可能高效快速,避免操作时间过长,增加组织污染的风险;②剪至糊状:组织应尽可能剪碎至糊状,以提高消化酶的消化效率,减少消化酶与组织的作用时间,最大程度降低消化酶对细胞的损伤。

原代细胞纯化是实验成功的关键环节;因组织的血管、纤维等复杂结构较多,导致细胞纯化困难。有文献证实,只有保证细胞纯化度达到 95% 以上时,细胞的生物学特性才能获得稳定<sup>[39]</sup>。故在实验过程中,有学者采用免疫荧光技术进行细胞鉴定,确保细胞纯度达标,为后续研究提供基础保证<sup>[40]</sup>。本研究因实验条件的限制,未能采用免疫荧光法鉴定纯度,是研究的不足之处;但实验严格按照原代细胞提取的操作步骤进行,力求最大程度保证细胞纯化,提高原代细胞的提取成功率;最终实验获得的原代细胞亦较为理想。由此本研究可以获得如下实验经验:在今后的相关研究中,如实验条件允许,不妨尝试采用裸鼠皮下肿瘤包埋法来提取原代细胞,并采用免疫荧光法鉴定细胞纯度,使获得的原代细胞更加优质,更加符合实验预期。

综上所述,通过皮下注射 A549/DDP 细胞悬液构建具有顺铂耐药性质的肺癌荷瘤裸鼠模型,是行之有效的造模方法;该模型可为进一步研究耐药发生与演变的生物学机制提供良好的载体。在后续实验中,可依托本实验模型,开展药物联合顺铂干预 A549/DDP 荷瘤裸鼠的实验研究,以探讨药物逆转顺铂耐药的治疗作用,以及相关机制。

#### [参考文献]

- [1] Ji N, Li H, Zhang Y, et al. Lansoprazole (LPZ) reverses multidrug resistance (MDR) in cancer through impeding ATP-binding cassette (ABC) transporter-mediated chemotherapeutic drug efflux and lysosomal sequestration [J]. Drug Resist Update, 2024, 76: 101100.
- [2] Duan C, Yu M, Xu J, et al. Overcoming Cancer Multi-drug Resistance (MDR): Reasons, mechanisms, nanotherapeutic solutions, and challenges [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 162: 114643.
- [3] Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies [J]. Cancer Res,

- 1970,30(4):1174-1184.
- [4] 刘一丹,乔云.中医药联合 EGFR-TKI 治疗非小细胞肺癌及逆转获得性耐药的研究进展[J].云南中医中药杂志,2024,45(8):74-79.
- [5] 侯鑫好,于涛,刘保杰,等.Alpha-bisabolol 逆转 ABCB1 介导的肿瘤多药耐药及机制[J].细胞与分子免疫学杂志,2024,40(11):968-975.
- [6] Zhang Y, Vagiannis D, Budagaga Y, et al. Sonidegib potentiates the cancer cells' sensitivity to cytostatic agents by functional inhibition of ABCB1 and ABCG2 in vitro and ex vivo[J]. *Biochem Pharmacol*,2022,199:115009.
- [7] 张乐乐,王学全,丁嘉佩,等.IGF2BP1 表达水平对肺腺癌顺铂耐药性影响的研究[J].药物生物技术,2024,31(3):232-240.
- [8] 王雪星,何媛,楚杰,等.含铂方案辅助化疗对老年晚期非小细胞肺癌患者生存的影响[J].数理医药学杂志,2023,36(12):899-905.
- [9] 朱长亮.miR-125b 通过调控 Bcl-2 和 ABCC4 的表达影响 A549/DDP 细胞系耐药性的研究[D].西安:第四军医大学,2014.
- [10] 王静,刘洪利,潘福勤,等.不同冻存方法对大鼠脂肪来源于干细胞生物学特性的影响[J].中国美容医学,2023,32(6):108-111.
- [11] 潘雄飞.人诱导性多能干细胞(iPSc)作用于人肺腺癌 A549 细胞在裸鼠体内增殖、成瘤和迁移过程的研究[D].厦门:厦门大学,2019.
- [12] 姜永新,刘凯丰,胡成祥,等.乌头汤及其配伍对抗类风湿性关节炎的机制[J].吉林大学学报(理学版),2025,63(1):191-200.
- [13] 董人华,徐焕焕,王秀丽,等.芪丹方主成分抑制肝星状细胞增殖及最佳配伍剂量[J].中国现代中药,2023,25(4):859-866.
- [14] 刘仁权.SPSS 统计分析教程[M].北京:中国中医药出版社,2016:137-139.
- [15] 翟渊粉,罗志丹,石晓,等.不同统计软件在医药生物学教学实验数据处理中的应用比较[J].中国医药科学,2024,14(2):74-77.
- [16] 吴凤玲,李秋香,李清,等.欧前胡素对乳腺癌他莫昔芬的多药耐药逆转作用及机制研究[J].中草药,2025,56(1):165-176.
- [17] 蔡文涛.MTT 法和 CCK-8 法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较[J].湖北大学学报(自然科学版),2017,39(3):305-310.
- [18] 洪慧蕾,徐建光,邱华.多孔钛表面 EGCG/PLL 酚胺涂层整合氯己定的抗菌性能探究[J].安徽医科大学学报,2025,60(1):109-116.
- [19] 金剑,劳嘉,钟灿,等.黄精发酵体系中植物乳杆菌的分离鉴定和 MTT 法活菌快速检测研究[J].湖南中医药大学学报,2022,42(2):246-250.
- [20] Tang XY, Tang YX, Xu P, et al. Effect of Peimine on ERCC1 mRNA and LRP expressions of A549/DDP multidrug resistance cell line [J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2015,35(12):1490-1494.
- [21] 吴翠芳,曾嵘,周于禄,等.芦荟大黄素对人肺腺癌细胞顺铂多药耐药性的逆转作用 [J]. 中国医院药学杂志,2008,28(13):1061-1063.
- [22] 詹鹏,槐耳浸膏联合重组人血管内皮抑素逆转人肺腺癌 A549/DDP 细胞耐药性的研究[D].大连:大连医科大学,2012.
- [23] 董昌盛,毕凌,阙祖俊,等.肺癌防治动物模型研究进展[J].现代肿瘤医学,2019,27(5):873-878.
- [24] 江海媚,施传坚,吴先林,等.中医肿瘤实验动物模型研究现状与展望[J].中医肿瘤学杂志,2024,6(6):89-94.
- [25] 余琛琳,崔淑芳.肺癌动物模型的制备与应用[J].中国实验动物学报,2008,16(6):470-474.
- [26] 谭骏岚,易健,王飞英,等.病证结合模式下肺癌实验动物模型的研究进展[J].中国比较医学杂志,2022,32(1):111-119.
- [27] 王金川,周浩伟,刘小贞,等.基于数据挖掘的非小细胞肺癌动物模型应用分析[J].中国医药导报,2024,21(29):23-30.
- [28] Jakubowska M, Sniegocka M, Podgórska E, et al. Pulmonary metastases of the A549-derived lung adenocarcinoma tumors growing in nude mice. A multiple case study [J]. *Acta Biochim Pol*,2013,60(3):323-330.
- [29] 薛艳芳,王莉翠,周依舒,等.移植性肺癌动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2023,31(3):410-416.
- [30] 吕欢欢,刘悦彤,王建萍,等.基于骨髓间充质干细胞分离培养的原代细胞培养技术在细胞生物学实验课程中的应用和思考[J].工业微生物,2023,53(6):41-44.
- [31] Mosher AA, Rainey KJ, Bolstad SS, et al. Development and validation of primary human myometrial cell culture models to study pregnancy and labour [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*,2013,13(Suppl 1):S7.
- [32] 罗寒雨,刘笑,郑菲菲,等.翘嘴鲈肝脏组织原代细胞培养技术的建立[J].水产科学,2024,43(5):808-816.
- [33] 杨晓乐.肺癌胸水肿瘤细胞的体外培养、鉴定及其对常规化疗药物敏感性研究[D].郑州:郑州大学,2017.
- [34] 赵爱玲,姚冬.改良组织块贴壁法培养小鼠气道平滑肌细胞及鉴定[J].医学研究与战创伤救治,2023,36(3):225-230.
- [35] 张帆,李柏霖,沈茗,等.改良组织块培养法提取原代大鼠脑微血管内皮细胞及鉴定[J].安徽医科大学学报,2025,60(1):10-14.
- [36] Fidler IJ. Biological heterogeneity of cancer: implication to therapy[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(8): 1141-1142.
- [37] Hu W, Liu Y, Zhou W, et al. CXCL16 and CXCR6 are coexpressed in human lung cancer in vivo and mediate the invasion of lung cancer cell lines in vitro[J]. *PLoS One*,2014, 9(6):e99056.
- [38] 柏梦如,徐佩雯,巩赫喆,等.大鼠肺成纤维细胞原代分离培养方法优化[J].解剖学杂志,2024,47(5):385-388.
- [39] 韦超,李冬华,钱睿亚,等.人子宫平滑肌瘤原代细胞培养方法的建立和优化[J].首都医科大学学报,2020,41(6):1002-1006.
- [40] Bonazza C, Andrade SS, Sumikawa JT, et al. Primary human uterine leiomyoma cell culture quality control: some properties of myometrial cells cultured under serum deprivation conditions in the presence of ovarian steroids[J]. *PLoS One*,2016,11(7):e0158578.