

# 人绒毛膜癌甲氨蝶呤耐药细胞株的建立及其特性的研究

陈亚侠, 谢 幸, 陈怀增, 程 琪, 周彩云  
(浙江大学医学院 附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

**[摘要]** 目的: 建立耐甲氨蝶呤(MTX)的人绒毛膜癌细胞株, 并检测其生物学特性。方法: 采用剂量递增间歇诱导的方法, 对人绒毛膜癌细胞株 JAR 进行长期诱导培养, 建立耐药细胞株 JAR/MTX。比较两种细胞倍增时间、绒毛膜促性腺激素(HCG)分泌量、对 MTX 和一些常用化疗药的敏感性、P-糖蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶、核增殖抗原的表达, 以及细胞自发和 MTX 诱导调亡率。结果: 历时 1 年建成 JAR/MTX 细胞株, 耐药性稳定, 耐药指数 7.3, 对紫杉醇、长春新碱有交叉耐药。JAR/MTX 细胞增殖缓慢, 核增殖抗原表达低于 JAR 细胞( $3.09 \pm 0.42$  vs  $3.72 \pm 0.35$ ,  $P < 0.05$ )。谷胱甘肽 S 转移酶表达高于 JAR, P-糖蛋白的表达两者无差异。HCG 分泌高于 JAR 细胞, 培养 48 h 后每  $10^5$  个细胞分泌 HCG 分别为( $95.7 \pm 5.4$  vs  $41.3 \pm 2.8$ )mIU( $P < 0.01$ )。JAR/MTX 细胞的自发调亡及 MTX 诱导的调亡均明显少于其母系 JAR 细胞( $P < 0.05$ )。结论: JAR/MTX 细胞对 MTX 耐药性稳定, 具有独特的细胞形态、染色体核型、增殖与调亡等特征, 为进一步研究绒癌的耐药机制提供了理想的细胞模型。

**[关键词]** 绒毛膜癌/药物疗法; 甲氨蝶呤/治疗应用; 抗药性; 肿瘤; 细胞培养  
**[中图分类号]** R 737.33      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1008-9292(2004)02-0138-05

**Establishment of methotrexate-resistant human choriocarcinoma cell line and its biological characteristics**  
CHEN Ya-xia, XIE Xing, CHEN Huai-zeng, et al (*The Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a methotrexate (MTX)-resistant choriocarcinoma cell line and to determine its biologic characteristics. **Methods:** MTX-resistant cell line (JAR/MTX) was derived from human choriocarcinoma cell line JAR by exposed to intermittently and progressively increasing concentration of MTX. Drug sensitivity was detected by MTT; P-gp, GST- $\pi$  and PCNA expressions were detected by immunohistochemistry. Cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM) with PI/Annexin V stain. Growth rates and human chorionic gonadotropin (HCG) production were also measured. **Results:** JAR/MTX cell line was established with stable MTX-resistance (resistance index to MTX was 7.3) and cross-resistant to TAX and VCR. Growthrate of JAR/MTX was lower than that of parent cell line JAR. Expression level of PCNA in JAR/MTX was lower than that in JAR ( $3.09 \pm 0.42$  vs  $3.72 \pm 0.35$ ,  $P < 0.05$ ), while GST- $\pi$  expression was higher. No statistical difference of P-gp expression existed between two cell lines. JAR/MTX secreted more HCG than JAR, every  $10^5$  cells secreted ( $95.7 \pm 5.4$  vs  $41.3 \pm 2.8$ )mIU after 48 h( $P < 0.01$ ). The flow cytometry showed that the spontaneous and MTX-induced apoptosis in JAR/MTX was significantly lower than that in JAR  $P < 0.05$ . **Conclusion:** JAR/MTX cell line presented stable resistant to MTX and cross-resistant to TAX and VCR, which might sever as a model in study of drug resistance in choriocarcinoma.

**[Key words]** Choriocarcinoma/drug ther; Methotrexate/ther use; Drug resistance, neoplasm; Cell culture

[ J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2004,33(2):138-142. ]

绒毛膜癌(绒癌)是一种对化疗敏感的实体肿瘤。甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)是治疗绒癌首选药物, 也是在绝大多数联合化疗方案中必需的药物, 但 MTX 获得性耐药严重, 单用 MTX 约 30% 患者将出现耐药<sup>[1,2]</sup>。体外诱导建立耐药细胞株是研究绒癌获得性耐药机理的重

收稿日期: 2003-04-30 修回日期: 2003-08-31  
基金项目: 浙江大学医学院中青年科研启动基金资助项目  
作者简介: 陈亚侠(1965—), 女, 博士生, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤临床和基础研究。  
通讯作者: 谢 幸(1955—), 男, 教授, 博导, 主要从事妇科肿瘤临床和基础研究。E-mail: Xiex@mail.hz.zj.cn

要方法。然而,用 MTX 诱导建立绒癌耐药细胞株迄今国内未见有文献报道,美国细胞库(American Type Culture Collection, ATCC)也无商品化的耐 MTX 的绒癌细胞株提供。本研究采用剂量递增间歇诱导的方法,建立体外获得性耐 MTX 的绒癌细胞株,并对其生物学特性进行研究,为绒癌耐药机制及耐药逆转的研究提供细胞模型。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 人绒毛膜癌细胞株 JAR 来自美国 ATCC,本室传代培养保存。细胞生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640(GIBCO 公司)培养基中,于 37℃、5% 二氧化碳的培养箱中传代培养。细胞呈多边形,贴壁生长。用 0.25% 胰酶(上海生工)消化传代,细胞数小时后即可贴壁,约 24 h 后进入指数生长期,每 2 d 传代 1 次。

**1.2 实验药物** MTX(浙江万马药业有限公司,批号 020112)、放线菌素 D(ACTD,上海新亚药业有限公司,批号 020905)、5-氟尿嘧啶(5-Fu,天津金耀氨基酸有限公司,批号 0210222)、环磷酰胺(CTX,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 02110821)、紫杉醇(TAX,美国百时美施贵宝公司,批号 2M522Si)、鬼臼乙叉甙(VP16,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 02082432)、阿霉素(ADM,浙江海正药业股份有限公司,批号 021004)、长春新碱(VCR,深圳万乐药业有限公司,批号 0212V1)。

**1.3 主要试剂** P-糖蛋白(P-gp),克隆号 C494,谷胱甘肽 S 转移酶(GST- $\pi$ ),克隆号 353-10 及核增殖抗原(PCNA),克隆号 PC10,均为鼠抗人单抗,购自福州迈兴公司。鼠抗人单抗二步法免疫组化试剂盒购自 Dako 公司。PI/Annexin V-FITC 试剂盒购自美国 Beckman coulter 公司。

**1.4 MTX 耐药细胞株的建立** 采用剂量递增间隙加药诱导耐药。JAR 细胞胰酶消化传代后次日细胞进入指数生长期,此时培养基中加入 MTX 至终浓度 11  $\mu\text{mol/L}$ ,加药 8 h 后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍后加无 MTX 的培养基继续培养,待培养瓶内细胞长满 80% 左右传代。此时,敏感细胞死亡上浮,不敏感细胞继续

存活,但继续存活的细胞生长缓慢形态改变。在无药培养基培养至细胞生长良好后再重复同一浓度 MTX 2~5 次后,再进行下一浓度 MTX 诱导,并逐渐增加诱导浓度。历时约 1 年,MTX 最高诱导浓度为 88  $\mu\text{mol/L}$ 。用四甲基偶氮唑蓝(MTT)快速比色法按照参考文献<sup>[3]</sup>步骤测半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)逐渐稳定。撤药培养 3 个月及液氮冻存 3 个月后复苏,复测 IC<sub>50</sub> 变化在 70% 以内。表明耐药性稳定。此时细胞命名为 JAR/MTX。

**1.5 JAR 及 JAR/MTX 细胞株的生物学特性测定** 所有指标都在无药培养 3 个月以后测定。

**1.5.1 细胞形态观察:** 用倒置相差显微镜及常规 HE 染色观察。

**1.5.2 对数生长期细胞群体倍增时间测定:** 采用细胞计数法<sup>[4]</sup>,每次计数 3 孔,重复 3 遍取平均值,绘制细胞生长曲线,按 Patterson 公式计算细胞在对数生长期的倍增时间。 $TD = T \times \log 2 / (\log N_t - \log N_0)^{[5]}$ 。N<sub>0</sub> 为初始细胞数,N<sub>t</sub> 为终末细胞数,T 为 N<sub>t</sub>-N<sub>0</sub> 时间。

**1.5.3 核型及细胞周期分布:** 用秋水仙素法<sup>[4]</sup>观察染色体核型,用流式细胞仪(FCM,美国 Beckman coulter 公司,型号为 EPICS<sup>®</sup> XL 检测细胞周期分布。以正常妇女外周血单个核细胞为标准对照。

**1.5.4 人绒毛膜促性腺激素(HCG)测定:** 采用时间分辨荧光定量法测细胞培养 48 h 后上清中总 HCG,根据细胞数计算每 10<sup>5</sup> 个细胞分泌 HCG 量。

**1.5.5 耐药谱分析:** 用 MTT 比色法,以 JAR/MTX 细胞株药物作用 48 h 的 IC<sub>50</sub> 和 JAR 细胞株 IC<sub>50</sub> 的比值表示耐药指数(resistance factor, RF)。

**1.5.6 细胞黏附性测定:** 细胞基本铺满培养瓶后倒去培养液,PBS 洗 3 遍,每瓶加 0.25% 胰酶,37℃ 放置 2 min 后倒去胰酶,加入 5 ml PBS,由电动移液器吹打 20 下,然后用血球计数板计算 2 细胞团、3 细胞团、4 细胞团及以上细胞团各占细胞总数的百分比(P<sub>i</sub>),其积分  $N = \sum P_i \times i \times 100$ ,i 为不同细胞数细胞团的系数;2 细胞团为 2,3 细胞团为 3,4 细胞团或以

上为 4。

1. 5. 7 P-gp、GST- $\pi$ 、PCNA 表达的检测：按免疫组化二步法试剂盒说明书中步骤行免疫组化染色，光镜观察结果判断，每批取同一阳性片作质控，以 PBS 代替一抗的免疫组化染色结果为阴性对照。在 Olympus 显微镜 400 $\times$  下观察，任意观察 5 个视野，分别读出其(－)、(＋)、(＋＋)和(＋＋＋)的细胞数。染色判断：(－)为细胞浆或细胞核内无棕黄色颗粒，(＋)为细胞浆或细胞核内出现较浅的黄色颗粒，(＋＋)为细胞浆或细胞核内出现清晰的深黄色颗粒，(＋＋＋)为细胞浆或细胞核内出现明显的棕色或咖啡色颗粒。结果参照 H-score 半定量法分析<sup>[6]</sup>。计算公式： $H\text{-score} = \sum Pi(i+1)$ 。其中  $i$  为染色强度，用 1, 2, 3 分别代表(＋)、(＋＋)、(＋＋＋)。  $Pi$  为同一染色强度细胞占总细胞数的百分比。

1. 5. 8 PI/Annexin V 细胞凋亡检测：按照试剂盒说明步骤，对不加药的 JAR/MTX 和 JAR 细胞及在 MTX 8. 8  $\mu\text{mol/L}$  的培养液中培养 72 h 的 JAR/MTX 和 JAR 细胞，用流式细胞仪检测 PI/Annexin V 的表达。

1. 6 统计学处理 两组间比较用  $t$  检验及卡方检验， $P<0. 05$  为统计学上差异有显著性。所有数据用 microsoft excel 及 SPSS10. 0 for Windows 进行处理。

2 结 果

2. 1 JAR/MTX 细胞株建立 历时约 1 年建成的耐药细胞株 JAR/MTX，测得对 MTX 作用 48 h 的  $IC_{50}$  为 5. 15  $\mu\text{mol/L}$ ，其母系 JAR 的  $IC_{50}$  为 0. 70  $\mu\text{mol/L}$ ，RF 为 7. 35，建株后无药培养及液氮冻存 3 个月以上复测耐药性基本稳定。

2. 2 JAR/MTX 细胞株的生物学特性

2. 2. 1 形态及黏附性：JAR/MTX 细胞在无

药培养 3 个月后，与 JAR 细胞相比，细胞呈不规则状，大小不等，有的细胞出现很长的突起；细胞浆内出现空泡，胞浆中黑色颗粒增多变粗；细胞与细胞之间黑色颗粒状物也明显增多。JAR/MTX 细胞易重叠生长，细胞间黏附性增加，传代时细胞不易吹散。JAR/MTX 及 JAR 细胞培养 48 h 的黏附性积分分别为  $142. 3 \pm 9. 1$  及  $74. 1 \pm 4. 8(P<0. 01)$ 。

2. 2. 2 细胞增殖及分泌 HCG 情况：JAR/MTX 细胞生长迟缓，每 3~4 d 传代 1 次，而 JAR 细胞每 2 d 传代 1 次。指数生长期群体倍增时间 JAR/MTX 及 JAR 分别为  $(32. 6 \pm 2. 8)\text{h}$  和  $(19. 6 \pm 1. 9)\text{h}(P<0. 01)$ ，PCNA 免疫组化 H-score 积分分别为  $3. 09 \pm 0. 42$  及  $3. 72 \pm 0. 35(P<0. 05)$ 。JAR/MTX 细胞较 JAR 细胞分泌更多的 HCG，培养 48 h 后每  $10^5$  个 JAR/MTX 及 JAR 细胞分泌的 HCG 分别为  $(95. 7 \pm 5. 4)\text{mIU}$  及  $(41. 3 \pm 2. 8)\text{mIU}(P<0. 01)$ 。用流式细胞仪分析细胞周期比例(%)，JAR/MTX 及 JAR 细胞  $G_0+G_1$  分别为  $55. 5 \pm 2. 9$  及  $48. 2 \pm 2. 4$ ， $G_2+M$  期分别为  $15. 3 \pm 1. 9$  及  $16. 3 \pm 1. 7$ ，S 期分别为  $29. 2 \pm 2. 8$  及  $30. 6 \pm 2. 7$ ，两种细胞株细胞周期分布无明显差异。

2. 2. 3 染色体分析：以正常人外周血单个核细胞作为标准对照，流式细胞仪分析细胞核型。JAR/MTX 核型异倍体占 95. 2%，二倍体仅占 4. 08%；JAR 细胞异倍体占 54. 53%，二倍体占 45. 47%。JAR/MTX 异倍体出现率明显高于 JAR，( $P<0. 01$ )。用秋水仙素法观察两种细胞染色体多数为假三倍体，集中于 67~71 条。

2. 3 JAR/MTX 细胞株的耐药谱分析 从表可以看出 JAR/MTX 细胞不但对 MTX 耐药，而且还对 TAX 特别是对 VCR 高度耐药。对 5-FU、ADM、ACTD、VP-16 仍敏感。见表 1。

表 1 两种细胞株对常用化疗药作用 48 h 的  $IC_{50}$

Table 1 The  $IC_{50}$  of JAR and JAR/MTX to common chemotherapy drugs after 48 h  
( $\mu\text{mol/L}$ )

| Group   | MTX   | TAX    | 5-FU    | ADM   | VCR      | ACTD  | VP-16 | CTX |
|---------|-------|--------|---------|-------|----------|-------|-------|-----|
| JAR     | 0. 70 | 0. 02  | 353. 63 | 4. 30 | 0. 04    | 1. 78 | 0. 78 | —   |
| JAR/MTX | 5. 15 | 0. 51  | 378. 80 | 3. 44 | 149. 27  | 2. 00 | 0. 85 | —   |
| RF      | 7. 35 | 25. 50 | 1. 07   | 0. 80 | 3731. 75 | 1. 12 | 1. 09 | —   |

2.4 P-gp、GST-π 免疫组化结果 见表 2。

表 2 两种细胞中 P-gp、GST-π 免疫组化 H-score 积分比较

Table 2 H-score of P-gp and GST-π expressed in JAR and JAR/MTX cell lines

( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| Group   | P-gp      | GST-π     |
|---------|-----------|-----------|
| JAR/MTX | 2.20±0.26 | 3.46±0.32 |
| JAR     | 2.31±0.25 | 2.19±0.23 |
| P       | >0.05     | <0.05     |

表 3 PI/Annexin V 检测自然及 MTX 诱导的细胞凋亡

Table 3 The spontaneous and MTX induced apoptosis in JAR and JAR/MTX detected by PI/Annexin V

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

| Group       | n  | Normal cell | Early apoptosis | Later apoptosis | Necrosis   |
|-------------|----|-------------|-----------------|-----------------|------------|
| JAR         | 10 | 76.99±3.14  | 1.33±0.12       | 1.39±0.16       | 20.29±2.72 |
| JAR+MTX     | 10 | 17.56±2.13  | 13.35±1.35      | 27.23±2.96      | 41.87±3.16 |
| JAR/MTX     | 10 | 90.06±4.65  | 0.07±0.001      | 0.28±0.007      | 9.59±0.92  |
| JAR/MTX+MTX | 10 | 71.33±3.16  | 0.50±0.012      | 1.64±0.21       | 26.53±2.35 |

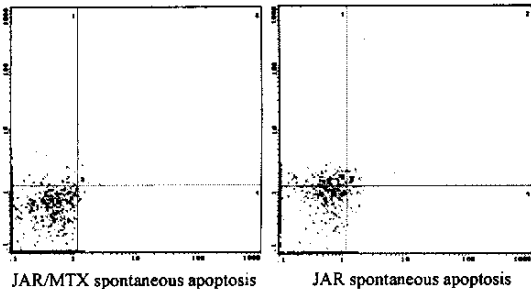


图 1 流式细胞仪检测 PI/Annexin V 染色

Fig. 1 PI/Annexin V stain tested by flow cytometry

3 讨 论

3.1 JAR/MTX 细胞的特性 JAR/MTX 细胞与其母系 JAR 细胞相比,细胞异形性明显、群体倍增时间延长、核增殖抗原表达减少、绝大多数细胞为异倍体、细胞间的黏附性增加,表明细胞在多次接触 MTX 后受到损伤致细胞生长缓慢,异倍体比例增加。MTX 是细胞分化诱导剂,可诱导多种细胞分化<sup>[7~9]</sup>。HCG 是滋养细胞分化的标志,JAR/MTX 细胞较其母系 JAR 细胞能分泌更多的 HCG,说明 JAR 细胞在 MTX 长期诱导后部分细胞成熟分化。细胞的

2.5 流式细胞仪检测 PI/Annexin V 的表达 图 1 所示,左上象限 PI(+)Annexin V (—) 为死亡的细胞,右上象限 PI(+)Annexin V (+) 为凋亡晚期细胞,右下象限 PI (—) Annexin V (+) 为凋亡早期细胞,左下象限 PI (—)Annexin V (—) 为活细胞。从表 3 可以看出在无药培养下,JAR/MTX 的自发凋亡明显少于 JAR 细胞( $P<0.05$ )。加 MTX 8.8 μmol/L 72 h 后两种细胞凋亡均较不加药组增加,但 JAR/MTX 细胞凋亡仍明显少于 JAR 细胞( $P<0.05$ )。

增殖速度及分化程度与化疗敏感性有关,一般来说增殖越快的幼稚细胞对化疗越敏感,这是化疗药物抗肿瘤治疗的基础,可能也是滋养细胞肿瘤对化疗较敏感的原因之一。本实验中 JAR/MTX 细胞生长缓慢、分化程度增加,可能与 JAR/MTX 细胞的耐药性有关。肿瘤对 MTX 产生耐药的机制涉及多种因素,在对 MTX 耐药的多种不同细胞系的研究中,通过减少叶酸载体而减少 MTX 的摄入、靶酶二氢叶酸还原酶(DHFR)活性增加及 DHFR 与 MTX 的亲合力降低被认为是 MTX 耐药的重要机制<sup>[10~13]</sup>。但仅用这些机制不能解释,在研究中发现的当对 MTX 出现耐药后也会对它其它抗癌机理不同于 MTX 的其它化疗药物耐药<sup>[14,15]</sup>,这提示存在其它的耐药机制。肿瘤产生多药耐药的机制涉及多种因素,但在诸多耐药机制中能在临床中得到证实的却很少,MDR1 过表达是唯一能在体内证实且最为重要的机制之一。我们的研究发现,在 JAR、JAR/MTX 细胞中均有 P-gp 的表达,表达强度相似。以往也有研究表明,在正常妊娠的滋养细胞中有 P-gp 表达,说明 P-gp 在正常妊娠的滋养

细胞中有解毒作用,而在绒癌耐药中并非起作用。GST- $\pi$  是体内重要的氧化还原系统,可催化谷胱甘肽与各种亲电子分子和疏水性分子结合,使其更有极性而加强外排,通过非酶结合方式将细胞内的毒性化学药物排除,同时在清除活性氧过程中起重要作用,参与机体解毒,并对多种引起细胞死亡的刺激起保护作用。在本研究中 GST- $\pi$  在 JAR/MTX 细胞中的染色强度高于 JAR 细胞,提示 JAR 细胞在长时间接触 MTX 后 GST- $\pi$  表达增加以对抗 MTX 的细胞毒作用,可能在 JAR/MTX 耐药中起一定作用。细胞凋亡是在众多基因有序激活后发生的一种主动的细胞死亡。随着对细胞凋亡研究的深入,发现细胞凋亡是众多化疗药物杀伤肿瘤细胞的共同通路之一,那么凋亡的抑制可导致耐药。流式细胞仪检测 PI/Annexin V 表达是一种简单、敏感的检测细胞凋亡方法<sup>[16,17]</sup>。本实验应用流式细胞仪检测 PI/Annexin V 表达发现同样培养条件下,JAR/MTX 的自然凋亡明显少于其母系 JAR 细胞。MTX 也可通过诱导 JAR 及 JAR/MTX 细胞凋亡而发挥细胞毒作用。但同样浓度的 MTX 对 JAR/MTX 诱发的凋亡明显少于其母系。因此,JAR/MTX 不易凋亡这一特性,可能是 JAR/MTX 不但对 MTX 耐药,而且还是对植物碱类化疗药 TAX、VCR 交叉耐药的重要机制之一。我们将对凋亡抑制在 JAR/MTX 耐药中的作用及其分子机制进行进一步的研究。

**3.2 建立耐药绒癌细胞株的意义** 肿瘤细胞发生耐药的机制很复杂,由于涉及化疗药物在体内的分布、代谢等,对耐药性的研究尤其复杂和困难。此外,由于多数绒癌患者可仅用化疗治愈,手术治疗并非是绒癌治疗首选和必须的治疗手段,手术切除的标本很少。因此,体外研究绒癌耐药的发生和逆转成为重要的方法之一。但国内外目前用于研究绒癌耐药机制的理想模型较少。MTX 作为治疗绒癌的首选药物,建立耐 MTX 的绒癌耐药模型具有重要的实用价值。绒癌细胞对化疗极敏感,诱导耐药细胞系较为困难。本研究通过多次筛选 MTX 起始诱导浓度,确定  $11 \mu\text{mol/L}$  为起始诱导浓度,且同一浓度需多次重复后才能进行下一浓度的诱导,

历时 1 年,成功地建立了耐 MTX 的绒癌细胞株。该细胞株对 MTX 耐药性稳定,且对 TAX 及 VCR 有交叉耐药,为进一步研究绒癌耐药机制及耐药逆转提供了理想的细胞模型。

## References:

- [1] GARRETT A P, GARNER E O, GOLDSTEIN D P, et al. Methotrexate infusion and folinic acid as primary therapy for nonmetastatic and low-risk metastatic gestational trophoblastic tumors. 15 years of experience [J]. *J Reprod Med*, 2002, 47(5): 355—362.
- [2] AGARWAL R, STRICKLAND S, McNEISH I A, et al. Doppler ultrasonography of the uterine artery and the response to chemotherapy in patients with gestational trophoblastic tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(5): 1142—1147.
- [3] HU X, YANG H, PAN Q R, et al. Does P-glycoprotein play a pivotal role in drug resistance of a MDR variant K562/DOX? [J]. *Chemotherapy*, 1995, 41(4): 296—299.
- [4] E Zhen (鄂 征). *Tissue culture and molecular technology (组织培养和细胞分子技术)* [M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Press, 1997: 156. (in Chinese)
- [5] BULTER M, DAWSON M. *Cell culture* [M]. Labfax Oxford: Bips Scientific Publisher, 1992: 34—38.
- [6] NISOLLE M, CASANAS-ROUX F, DONNEZ J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 1997, 68(5): 912—919.
- [7] MOLLER B, KUKOC-ZIVOJNOV N, OKAMGBA S, et al. Folinic acid antagonizes methotrexate-induced differentiation of monocyte progenitors [J]. *Rheumatol Int*, 2002, 22(2): 60—67.
- [8] KARL P L, HARVEY B, FISHER S E, et al. Ethanol and mitotic inhibitor primote differentiation of trophoblastic cells [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996, 20(7): 1269—1274.
- [9] KITAMURA H, CHO M, LEE B H, et al. Alteration in mucin gene expression and biological properties of HT29 colon cancer cell subpopulations [J]. *Eur J Cancer*, 1996, 32A(10): 1788—1796.
- [10] BANERJEE D, MAYER-KUCKUK P, CAPIZUX G, et al. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1587(2-3): 164—173.
- [11] TAKEMURA Y, KOBAYASHI H, MIYACHI H. Antifolate resistance and its circumvention by new analogues [J]. *Hum Cell*, 2001, 14(3): 185—202.

NF- $\kappa$ B 活性,使 RASF 的 COX-2 和 iNOS 基因表达水平下调,导致关节滑膜 PGE2 和 NO 合成减少,最终抑制 RA 病程发展,减轻关节炎症和改善临床症状。这可能是临床上雷公藤制剂发挥抗类风湿关节炎作用的机制之一。

References:

[1] YAO Hang-ping, XU Jian-zhong, ZHANG Li-huang (姚航平,徐建忠,张立煌). Expression of interleukin-18 in serum, synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis [J]. **Chinese Journal of Rheumatology (中华风湿病学杂志)**, 2002, 6(2): 80—83. (in Chinese)

[2] YAO Hang-ping, LI Ming-wei, ZHANG Li-huang, et al (姚航平,李敏伟,张立煌,等). Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human rheumatoid synovial fibroblasts [J]. **Chinese Journal of Laboratory Medicine (中华检验医学杂志)**, 2002, 25(6): 345—348. (in Chinese)

[3] NEEDLEMAN P, MANNING P T. Interactions between the inducible cyclooxygenase-2 (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) pathways: Implications for therapeutic intervention in osteoarthritis [J]. **Osteoarthritis Cartilage**, 1999, 7(4): 367—370.

[4] PELLETIER J P, JOVANOVIC D, FERNANDES J C, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. **Arthritis Rheum**, 1998, 41(7): 1275—1286.

[5] SHI Shao-hua, ZHEN Gui-hua, ZHENG Shu-sen(施邵华,陈规划,郑树森). Experimental study on the activity of inducible nitric oxide synthase in the acute cardiac allograft rejection of rats [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences (浙江大学学报:医学版)**, 2001, 30(6): 268—271.

[6] WU Jiang, LIN Xiao-xia, LIU Zi-yi(吴江,林晓霞,刘子贻). Effect of carotenoids on nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences (浙江大学学报:医学版)**, 2001, 30(5): 211—214.

[7] CHEN B J. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F [J]. **Leuk Lymphoma**, 2001, 42(3): 253—265.

[8] GU W Z, BRANDWEIN S R. Inhibition of type II collagen-induced arthritis in rats by triptolide [J]. **Int J Immunopharmacol**, 1998, 20(8): 389—400.

[9] MIGITA K, TANAKA H, OKAMOTO K, et al. FK506 augments glucocorticoid-mediated cyclooxygenase-2 down-regulation in human rheumatoid synovial fibroblasts [J]. **Lab Invest**, 2000, 80(2): 135—141.

[10] ZHAO G, VASZAR L T, QIU D, et al. Anti-inflammatory effects of triptolide in human bronchial epithelial cells [J]. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2000, 279(5): L958—L966.

[11] LIN N, SATO T, ITO A. Triptolide, a novel diterpenoid triepoxide from *Tripterygium wilfordii* Hook. f, suppresses the production and gene expression of pro-matrix metalloproteinases 1 and 3 and augments those of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in human synovial fibroblasts [J]. **Arthritis Rheum**, 2001, 44(9): 2193—2200.

[12] QIU D, ZHAO G, AOKI Y, et al. Immunosuppressant PG490 (triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cell and NF- $\kappa$ B transcriptional activation [J]. **J Biol Chem**, 1999, 274(19): 13443—13450.

[责任编辑 黄晓花]

(上接第 142 页)

[12] de NONANCOURT-DIDION M, GUEANT J L, ADJALLA C, et al. Overexpression of folate binding protein alpha is one of the mechanism explaining the adaptation of HT29 cells to high concentration of methotrexate [J]. **Cancer Lett**, 2001, 171(2): 139—145.

[13] ROTS M G, WILLEY J C, JANSEN G, et al. mRNA expression levels of methotrexate resistance-related proteins in childhood leukemia as determined by a standardized competitive template-based RT-PCR method [J]. **Leukemia**, 2000, 14(12): 2166—2175.

[14] GOTO S, OKAYAMA Y, FAN C, et al. Methotrexate-induced resistance to dactinomycin in choriocarcinoma [J]. **Cancer**, 1988, 62(5): 873—

877.

[15] NORRIS M D, De-GRAAF D, HABER M, et al. Involvement of MDR1 P-glycoprotein in multifactorial resistance to methotrexate [J]. **Int J Cancer**, 1996, 65(5): 613—619.

[16] GRANERUS M, JOHANNISSON A, EKHLOM P, et al. Insuline-like growth factors I and II induce cell death in Wilms's tumour cells [J]. **Mol-Pathol**, 2001, 54(1): 30—35.

[17] HOOD K A, WEST L M, NORTHCOTE P T, et al. Induction of apoptosis by the marine sponge(Mycale) metabolites, mycalamide A and pateamine [J]. **Apoptosis**, 2001, 6(3): 207—219.

[责任编辑 黄晓花]