论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1420-04

脑胶质瘤化疗药物的体外敏感性试验研究

苏祖禄,苏 海,张 毅,陈 皓 (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院神经外科)

[摘要] **目的** 探讨采用MTT法检测肿瘤化疗药对脑胶质瘤细胞的敏感性。**方法** 分离临床实体瘤标本(原代脑胶质瘤组织)制备单细胞悬液,包括U87细胞进行体外培养,将临床上常用的8种肿瘤化疗药5-氟尿嘧啶(5-Fu)、卡铂(CBP)、顺铂(DDP)、阿霉素(DOX)、甲氨蝶呤(MTX)、依托泊苷(VP-16)、丝裂霉素(MMC)、长春新碱(VCR)配成3种不同的浓度(5-Fu的终浓度为250、500、750 μg/mL,其他肿瘤化疗药终浓度50、100、150 μg/mL),采用MTT法检测,计算各肿瘤化疗药物对肿瘤细胞的抑制率。**结果** 8种肿瘤化疗药对原代脑胶质瘤的抑制效率依次为:ADM > MMC > DDP > VCR > 5-Fu > VP-16 > CBP > MTX;其中ADM的敏感度最高(抑制率95.54%);其次是MMC和DDP(抑制率>60%),MTX最不敏感(11.29%)。7种化疗药物对U87细胞株的抑制率依次为:ADM > VP-16 > CBP > MMC > 5-Fu > DDP > MTX;ADM的抑制率最高(91.19%),最不敏感的是MTX,其次是DDP(二者<30%)。DDP对于U87细胞抑制率较低,属于耐受药,但作用于原代脑胶质瘤细胞时细胞毒作用较大,为敏感性化疗药物。**结论** MTT法体外药敏试验为指导实体瘤患者的临床化疗方案提供了有效数据,可减少用药的盲目性,提高个体化治疗效果。

[关键词] MTT法;体外药敏试验;化疗

[中图法分类号] R739.41; R965.3; R979.1 [文献标志码] A

In vitro chemosensitivity of cerebral glioma to chemotherapeutic drugs

Su Zulu, Su Hai, Zhang Yi, Chen Hao (Department of Neurosurgery, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, China)

[**Abstract**] Objective To evaluate the sensitivity of human cerebral glioma to chemotherapeutic drugs by MTT assay. Methods *In vitro* sensitivities of primary cerebral glioma cells and U87 glioma cells to eight chemotherapeutic drugs such as adriamycin (ADM), 5-fluorouracil (5-Fu), carboplatin (CBP), cisplatin (DDP), methotrexate (MTX), etoposide (VP-16), mitomycin (MMC) and vincristine (VCR) were determined by modified MTT assay. Results In primary cerebral glioma cells, the sensitivity to the eight chemotherapeutic drugs from high to low was ADM > MMC > DDP > VCR > 5-Fu > VP-16 > CBP > MTX. Among those, ADM was the most effective chemotherapeutic drug to glioma cells with an inhibitory rate of 95.54%. Meanwhile, in U87 glioma cells, the sensitivity to seven chemotherapeutic drugs from high to low was ADM > VP-16 > CBP > MMC > 5-Fu > DDP > MTX. ADM was the most effective chemotherapeutic drug to U87 cells with an inhibitory rate of 91.19%. U87 glioma cells were not sensitive to MTX and DDP, and the inhibitory rate was less than 30%. Conclusion MTT assay is a rapid method for screening antineoplastic agent against glioma. The glioma cells are more sensitive to ADM *in vitro* than to MMC, VCR, 5-Fu, VP-16, CBP and MTX. Evaluation of the chemotherapeutic drugs to human glioma by MTT assay can be a helpful guidance for clinical chemotherapy, and improve the effectiveness of individualized chemotherapy.

[**Key words**] MTT assay; drug sensitivity; chemotherapy

Corresponding author: Su Hai, E-mail: 26988803@qq.com

肿瘤已成为严重威胁人类健康的头号杀手,手术切除、物理放疗、化疗是治疗恶性肿瘤的三大支柱,其中化疗是重要手段之一。肿瘤是一个异质性、多态性、分化不均的细胞群体,不同类型的肿瘤对同一化疗药的敏感性不同,这与肿瘤生物学特性、患者个体差异、肿瘤化疗药本身的毒性反应等因素有关,又因耐药性的存在,尤其是多药耐药性,这使得肿瘤化疗效果大大降低。

[通信作者] 苏 海,E-mail:26988803@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130329.1016.007.html(2013-03-29)

自1953年,Black和Spear首先报道了癌标本的体外药敏试验后,化疗药敏试验从此拉开了序幕。1983年Mosmann[1]报道了应用MTT法研究肿瘤细胞的生长和生存状况,体外药敏试验得到了迅速的发展,如梁永钜等[2]的组织块培养药敏试验、Jordan等[3]应用人脑胶质瘤细胞系进行MTT体外化疗敏感性试验均表明,没有一种药物能抑制所有肿瘤细胞的生长。以合理用药为中心的体外药敏试验除了能指导临床用药以外,在评估化疗方案的疗效、筛选新药、制定新的化疗方案、恶性肿瘤预后判断以及与肿瘤相关的基础研究等方面都有极其重要的指导意义。

本试验将采用MTT体外药敏试验法,检测肿瘤化疗药对脑胶质瘤的抑制效果,旨在为临床个体化用药提供依据。

1 资料与方法

1.1 试剂与材料

DMEM/HIGH Glucose,HyClone公司;小牛血清(FBS),杭州四季青生物工程材料有限公司;MTT,Sigma公司;二甲亚砜(分析纯),重庆医药股份有限公司化玻分公司;所有试验药品由重庆医科大学附属永川医院药剂科提供;5例新鲜的脑胶质瘤组织块(2009年5月至2011年8月经病理确诊的脑胶质瘤患者5例,男性3例,年龄43~76岁,中位年龄60岁;女性2例,年龄39~65岁,中位年龄55岁)由重庆医科大学附属永川医院神经外科提供;U87细胞来源于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 肿瘤化疗药浓度配制

根据国际用血浆峰浓度值,将顺铂(DDP)、卡铂(CBP)、丝裂霉素(MMC)、多柔比星(ADM)、依托泊苷(VP-16)、长春新碱(VCR)、氨甲蝶呤(MTX)用PBS液配制成终浓度为150、100、50 μg/mL各200 μL(表1);5-氟尿嘧啶(5-Fu)用PBS溶液配制成终浓度为750、500、250 μg/mL各200 μL。-20 ℃冰箱保存备用。

表1 肿瘤化疗药物的配制方法

药物	标示量	储备液浓度(mg/mL)	高浓度加药体积(μL)	中浓度加药体积(μL)	低浓度加药体积(μL)
5-Fu	0.25 g/10 mL	25	90	60	30
VP-16	0.1 g/5 mL	5	90	60	30
CBP	100 mg/10 mL	10	45	30	15
DDP	10 mg/2 mL	5	90	60	30
VCR	1 mg	5	90	60	30
ADM	10 mg	5	90	60	30
MMC	2 mg	5	90	60	30
MTX	5 mg	5	90	60	30

1.3 化疗敏感性检测

1.3.1 细胞培养 活组织标本为临床脑胶质瘤患者手术切除当日新鲜无污染标本,标本取自肿瘤边缘活组织较多的部分,收集在血清培养液中后在无菌室超净工作台进行操作。用不含血清的培养液清洗标本,以无菌眼科剪剪碎成约1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块,放入含20%小牛血清和混合消化液的DMEM培养液,37 ℃消化2 h,100目尼龙筛网过滤,获单细胞悬液,置于37 ℃,5%培养箱进行原代培养,观察。

1.3.2 MTT检测 将2×10^4/mL细胞悬液种入96孔板中,每孔140 μL,加不同肿瘤化疗药物的试验组各设8个重复孔,加抗肿瘤药物的浓度参照血浆峰浓度(plasma peak concentration, PPC)分别为10×PPC、1×PPC、0.1×PPC、每孔10 μL,留8孔作为不加药的细胞生长孔,补加10 μL含血清培养液,使总液体量为150 μL。将细胞培养板置于37 ℃,5% CO_2培养箱内培养;细胞铺板24 h之后贴壁,向试验组加药10 μL/孔,在上述条件下的孵箱中继续培养24 h;肿瘤化疗药处理后向培养后的96孔板中加入0.5% MTT溶液,20 μL/孔,继续培养4 h。快速翻转96孔板,甩去含MTT的培养上清液,倒扣在吸水纸上吸去残余液体,按150 μL/孔加入DMSO,放入酶标仪,在酶标仪上振摇8 min,在570 nm波长处测量$D(570)$值。同时设置空白孔及对照孔。

细胞增殖抑制率(IR)$=1-[D(570)_{对照组}-D(570)_{试验组}]/D(570)_{对照组}\times100\%$

药敏评价参照洪本英等[12]的药物试验评价标准,抑制率>50%,认为该药敏感,30%~50%为中度敏感,<30%为不敏感(耐药)。

1.4 统计学处理

结果以$\bar{x}\pm s$表示,所有检验均应用SPSS 13.0软件进行处理,统计学方法选用单因素方差分析;两两之间比较,方差齐性采用Tukey法,方差非齐性则采用Games-Howell法。

2 结果

2.1 原代脑胶质瘤结果

2.1.1 各单药对原代脑胶质瘤细胞抑制率 以胶质瘤细胞在PPC孔的细胞增殖抑制率为评价标准,表2结果显示,卡铂高浓度(150 μg/mL)与低、中浓度抑制率有显著性差异($P<0.05$),而低中浓度间抑制率无较大差异,其抑制率具有浓度依赖性,且随浓度的增大而增高;5-Fu抑制率随浓度的增大而降低,低浓度抑制率与高浓度抑制率有显著性差异($P<0.05$);DDP各浓度抑制率随浓度的增大而升高,且抑制率都有显著性差异;ADM各浓度间抑制率具有显著性差异($P<0.05$),且中浓度时抑制率最高;MTX高浓度时抑制率最低,且与中低浓度的抑制率存在显著性差异($P<0.05$);MMC各浓度的抑制率随浓度升高而升高,且相互间存在显著性差异($P<0.05$);VCR各浓度的抑制率无显著性差异($P>0.05$);VP-16低浓度抑制率最低,分别与中高浓度抑制率有显著性差异($P<0.05$)。

2.1.2 原代脑胶质瘤细胞对8种肿瘤化疗药的敏感性 根据国际用血浆峰浓度值,将中浓度项(5-Fu中浓度为50 μg/mL,其他肿瘤化疗药都为100 μg/mL)的抑制率进行敏感性研究。

从表3可看出,8种肿瘤化疗药对原代胶质瘤细胞的抑制率从高到低依次ADM>MMC>DDP>VCR>5-Fu>VP-16>CBP>MTX。其中ADM的敏感度最高,抑制率达到了95.54%。其次是MMC和DDP,抑制率>60%,MTX最不敏感,抑制率仅有11.29%。

表2 8种肿瘤化疗药物低、中、高浓度对胶质瘤细胞的抑制率比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

浓度	CBP	5-Fu	DDP	ADM	MTX	MMC	VCR	VP-16
低浓度	10.15±6.85	62.82±5.14	43.67±4.43	70.98±9.19	11.33±4.15	83.27±4.57	55.11±7.64	34.00±10.05
中浓度	12.74±7.48	57.64±4.22	67.97±2.98[a]	95.54±1.97[a]	11.29±3.47	92.08±2.81[a]	60.39±9.21	49.72±9.15[a]
高浓度	23.83±11.16[a]	53.91±2.77[a]	84.82±2.05[ab]	90.97±3.10[ab]	4.65±3.72[ab]	96.95±1.72[ab]	56.22±7.80	59.00±6.55[a]

a:$P<0.05$,与低浓度比较;b:$P<0.05$,与中浓度比较

表3 原代脑胶质瘤细胞对8种肿瘤化疗药的敏感性分析($n=8$)

项目	ADM	MMC	DDP	VCR	5-Fu	VP-16	CBDCA	MTX
IR[($\bar{x}\pm s$)%]	95.54±1.97	92.08±2.81	67.97±2.98	60.39±9.21	57.64±4.22	49.72±9.15	12.74±7.48	11.29±3.47
敏感性	++	++	++	++	++	+	-	-

2.2 U87细胞结果

2.2.1 7种肿瘤化疗药对U87细胞抑制率 CBP、5-Fu、DDP、MTX、VP-16各浓度抑制率间无显著性差异($P>0.05$);阿霉素高浓度抑制率分别与低、中浓度存在显著性差异($P<0.05$);MMC低浓度抑制率与高浓度抑制率具有显著性差异($P<0.05$)。见表4。

2.2.2 U87细胞对8种肿瘤化疗药的敏感性 根据国际用血浆峰浓度值,将中浓度项(5-Fu中浓度为50 μg/mL,其他肿瘤化疗药都为100 μg/mL)的抑制率进行敏感性研究。抑制率从高到低依次为:ADM > VP-16 > CBP > MMC > 5-Fu > DDP > MTX。其中,MTX和DDP抑制率都小于30%,属于耐受肿瘤化疗药。见表5。

3 讨论

近来有研究[4-5]采用体外药敏试验得出了胶质瘤原代细胞培养对不同肿瘤化疗药的敏感性顺序,并将其与临床疗效相比较,表现出较高的阳性符合率和耐药符合率,其他诸如此类的研究也较多[6-9]。陈建文等[10]应用此法研究脑胶质瘤是发现客观有效率及疾病控制率在药敏试验敏感组显著高于耐药组。蒋芹等[11]在对食管癌的研究后,报道了联合用药者的化疗总体敏感度高于单一用药者。在肝癌的化疗预测中,Jordan等[3]对45例原发性肝癌患者进行试验,研究发现11种化疗药中,MMC的敏感率最高,达到75.6%,而VCR的敏感率最低,0例敏感,6例中度敏感,敏感率为13.3%。在与临床相关性的研究也发现MTT敏感组的敏感率(82.2%)明显高于经验对照组的敏感率(48.9%)。结果显示,MTT法能为临床治疗提供可靠的用药依据,如果广泛运用,对控制肿瘤转移、复发率以及提高患者生存率都有起着积极的作用。

目前国际上没有形成统一的技术标准,例如肿瘤化疗药浓度的采用、肿瘤化疗药与细胞的作用时间、敏感标准的设立以及结果的正确判断。蒋芹等[11]采用血浆峰浓度的1/10,而洪本英等[12]则根据国际用血浆峰浓度,将肿瘤化疗药配制成为100 μg/mL和500 μg/mL(5-Fu),在脑胶质的研究中,倪炜等[5]直接将标示量原液稀释成几个梯度浓度进行试验。

根据国际泳峰值浓度,将肿瘤化疗药的中浓度(5-Fu:500 μg/mL,其他肿瘤化疗药:100 μg/mL)项的抑制率进行比较。8种肿瘤化疗药对原代胶质瘤细胞的抑制率从高到低依次ADM > MMC > DDP > VCR > 5-Fu > VP-16 > CBP > MTX。其中ADM的敏感度最高,抑制率达到了95.54%;其次是MMC和DDP,抑制率都大于了60%,MTX最不敏感,抑制率仅有11.29%。5-Fu与VCR在低中高各个浓度下的抑制率都无显著性差异,且抑制率都>50%,为原代脑胶质瘤敏感性肿瘤化疗药,临床治疗时刻考虑替换用药。CBP与MTX虽也效果相当,但抑制率都较低,为耐受性肿瘤化疗药,临床治疗时应避免使用,以增加化疗效果,减少患者的毒副作用和巨大的经济负担。

表4 7种肿瘤化疗药低中高浓度对U87的抑制率比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

浓度	CBP	5-Fu	DDP	ADM	MTX	MMC	VP-16
低浓度	50.70±28.92	37.43±14.44	28.05±10.14	92.31±3.68	11.35±5.61	42.59±7.83	62.52±9.90
中浓度	53.76±17.98	40.56±11.65	23.08±11.88	91.19±2.07	12.29±8.63	49.39±2.91	65.49±14.67
高浓度	44.36±24.10	42.40±19.12	26.70±17.66	79.64±3.44[ab]	13.38±7.74	55.61±9.91[a]	62.81±8.25

a:$P<0.05$,与低浓度比较;b:$P<0.05$,与中浓度比较

表5 U87细胞对7种肿瘤化疗药的敏感性分析($n=8$)

项目	ADM	VP-16	CBP	MMC	5-Fu	DDP	MTX
IR[($\bar{x}\pm s$)%]	91.19±2.07	65.49±14.67	53.76±17.98	49.39±2.91	40.56±11.65	23.08±11.88	12.29±8.63
敏感性	++	++	++	+	+	-	-

在U87细胞研究中,7种肿瘤化疗药抑制率从高到低依次为:ADM > VP-16 > CBP > MMC > 5-Fu > DDP > MTX。ADM的抑制率最高,达到了91.19%,最不敏感的是MTX,其次是DDP,两者抑制率都小于30%,属于耐受肿瘤化疗药。7种肿瘤化疗药各自3个浓度抑制率比较,阿霉素抑制率随浓度的增大而减小,丝裂霉素抑制率随浓度增大而升高,其他肿瘤化疗药各浓度抑制率都无显著性差异,表明试验时应减小浓度,以避免浪费或产生毒副作用。

许多学者的体外药敏试验研究结果同时强调肿瘤化疗药的敏感性和耐药性的检测是不等价的。在大数量病例检测中,耐药性的检测准确率往往比敏感性的准确率要高。陈建文等[10]发现147例标本中,总成功率达到了58%。体外药敏试验结果与临床治疗效果的总符合率为82.8%,阳性符合率为71.4%,阴性符合率为93.3%。与Higashiyama等[13]的试验结果(PPV=50%,NPV=92%)相符。在药敏试验中,药敏性固然重要,耐药性检测也存在价值,因为根据试验可以排除无效药,提高治疗效果。

肿瘤化疗药物敏感性试验的每种方法各有其优点和局限性,单用某一种方法难以肯定化疗药物的抗肿瘤效应。目前最为广泛运用的MTT法也存在一定的不足,MTT经还原所产生的甲瓒产物不溶于水,需被溶解后才能检测,这不仅使工作量增加,也会对试验结果的准确性产生影响,DMSO对人体有一定的损害,当标本混有正常细胞时会影响结果的判断。另外,MTT法和ATP-TCA法[14-15]都需要制备单细胞悬液才能进行试验,此方法使得肿瘤细胞的生长环境与在体内肿瘤组织中的生长环境呈现出一定的差别,不能非常准确地预测体内肿瘤细胞对肿瘤化疗药的反应。梁永钜[2]采用组织块培养的方法使肿瘤细胞在与体内环境相近的条件下进行试验,其试验结果敏感性相对于MTT法偏低,但与临床结果更为符合。组织块内肿瘤细胞比单层培养细胞对肿瘤化疗药有更强的耐药性,但试验数据更可靠。

探索精准的体外药敏试验一直是肿瘤学科中一个十分重要的课题,它在指导临床合理用药以及个体化治疗方面有着不可低估的作用[16]。本研究中MTT法能较好地反映出各种化疗药物对脑胶质瘤细胞的敏感性,对脑胶质瘤患者临床个体化治疗效果有预见价值,可以帮助临床医师选择有效的化疗药物,由于药物在体内代谢、解毒、排泄速度与体外试验有较大的差异,体外药敏试验对药物进行初步筛选和敏感度的预测,尤其是为临床患者设计合理的个体化治疗方案,避免无效药物所致的不良反应,以提高治疗效果方面具有重要的价值。

参考文献:

[1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55-63.
[2] 梁永钜, 符立梧. 一种新的组织块培养肿瘤药敏试验法[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(18): 1793-1797.
[3] Jordan J P, Hand C M, Markowitz R S, *et al*. Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of colorimetric MTT assay[J]. J Neurooncol, 1992, 14(1): 19-35.
[4] 米彦军, 张传钊, 符立梧. 肿瘤药敏试验指导个体化治疗的研究进展[J]. 药学学报, 2009, 44(11): 1187-1192.
[5] 倪炜, 李佳, 赵培超, 等. 体外胶质瘤细胞原代培养对不同化疗药物敏感性初步研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(6): 1115-1116, 1131.
[6] Ariyoshi Y, Shimahara M, Tanigawa N. Study on chemosensitivity of oral squamous cell carcinomas by histoculture drug response assay[J]. Oral Oncol, 2003, 39(7): 701-707.
[7] 刘德传, 郭以河. 四甲基偶氮唑盐比色法测定原发性肝癌对化疗药物的敏感性[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(19): 1699-1701.
[8] Sargent J M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples[J]. Recent Results Cancer Res, 2003, 161: 13-25.
[9] Samson D J, Seidenfeld J, Ziegler K. Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(17): 3618-3630.
[10] 陈建文, 张俊平, 程金建, 等. 体外药敏试验指导的恶性脑胶质瘤预见性化疗[J]. 广东医学, 2005, 26(9): 1183-1185.
[11] 蒋芹, 匡久树, 黄小明, 等. MTT法体外检测癌细胞药敏试验及临床相关性研究[J]. 实用癌症杂志, 2001, 16(1): 57-59.
[12] 洪本英, 杨勇, 赵朝辉. MTT体外药敏试验在指导恶性肿瘤化疗中的作用[J]. 咸宁医学院学报, 2001, 15(3): 190-191.
[13] Higashiyama M, Oda K, Okami J, *et al*. Prediction of chemotherapeutic effect on postoperative recurrence by *in vitro* anticancer drug sensitivity testing in non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2010, 68(3): 472-477.
[14] Kim H A, Yom C K, Moon B I, *et al*. The use of an *in vitro* adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay to predict chemotherapeutic response in breast cancer[J]. Breast, 2008, 17(1): 19-26.
[15] Dawson T P, Iyer R V, Lea R W, *et al*. The MTS vs. the ATP assay for *in vitro* chemosensitivity testing of primary glioma tumour culture[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2010, 36(6): 564-567.
[16] Qi C J, Ning Y L, Zhu Y L, *et al*. *In vitro* Chemosensitivity in breast cancer using ATP-tumor chemosensitivity assay[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(12): 1737-1742.

(**收稿**:2013-01-05;**修回**:2013-03-11)
(编辑 栾 嘉)