维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)02－0172－03

喉癌和鼻咽癌体外药敏试验 AgNOR 法的实验及临床研究

胡国华[1]，魏莲枝[1]，孙余才[1]，董蒲江[2]，朱　江[1]

(1.重庆医科大学临床学院耳鼻咽喉科，重庆　400016；2.重庆医科大学临床学院器官移植研究室，重庆　400016)

【摘　要】目的：用嗜银蛋白检测技术(AgNOR)分析喉癌和鼻咽癌对 8 种常用化疗药物的敏感性。方法：从 56 例喉癌和鼻咽癌患者获取新鲜肿瘤组织标本，采用单纯机械分离法制备单细胞悬液，加入抗癌药物后培养 36h，细胞悬液涂片、银染，计数银染颗粒后计算均值下降率；12 例患者同期行化疗。结果：51 例肿瘤获得实验成功，可评价率为 91.1%；AgNOR 颗粒均值下降率从 0～63%，在 8 种单一药物中，对 DDP 的敏感率最高，其它较为敏感的药物为 VCR、5－FU、PYM；鼻咽癌对抗癌药物的敏感性显著高于喉癌对抗癌药物的敏感性；体外药敏与体内疗效的总符合率为 80%。结论：AgNOR 技术简便易行，与临床相关性好，是一种有应用前景的体外药敏筛选方法。

【关键词】喉癌；鼻咽癌；体外药敏；AgNOR

【中国图书分类法分类号】R739.65　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－06－17

Experimental and clinical study of in vitro chemosensitivity assay for laryngeal carcinoma and nasopharyngeal carcinoma by AgNOR methods

HU Guohua, et al

(*Department of Otorhinolaryngology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate in vitro chemosensitivity of laryngeal carcinoma and nasopharyngeal carcinoma to eight kinds of antineoplastic drugs by AgNOR technique. *Methods*: Fresh specimens of 56 cases were obtained from laryngeal carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. We severed tumor tissue with simple mechanical separation method. After the acting of drugs, cell smear and argyrophilic staining, the mean inhibiting rate was calculated. 10 cases were treated with chemotherapy at the same time. *Results*: 51 cases' specimens succeeded in the experiments, and the rate of success was 91.1%. The changes of mean inhibiting rate was from 0 to 63%. The chemosensitivity to DDP was the highest in eight kinds of antineoplastic drugs. Secondly, VCR, 5－FU, and PYM were the highest. The sensitivity to drugs in laryngeal carcinoma was significantly higher than nasopharyngeal carcinoma. The coincidence between the experiment and clinic was 80%. *Conclusion*: AgNOR method is simple and convenient. In addition, it has clear correlation with the results of therapy. The method is useful for chemotherapy.

【Key words】Laryngeal carcinoma; Nasopharyngeal carcinoma; In vitro chemosensitivity; AgNOR

在恶性肿瘤的综合治疗中，化疗正发挥着越来越重要的作用。但是，临床医师一般是根据经验和抗药谱来制定化疗方案，主观性和盲目性较大，影响化疗效果。我们应用细胞核仁组成区嗜银蛋白技术(AgNOR)作为抗癌药物敏感试验，检测了 56 例喉癌和鼻咽癌对 8 种头颈部常用化疗药物的敏感性，部分患者根据药敏结果制定化疗方案，获得较好效果，现报道如下。

作者介绍：胡国华(1963－　)，男，副教授，博士，主要研究方向：头颈肿瘤。

基金项目：重庆市科委应用基础基金资助(渝科发计字[2002]18 号 101)。

1　材料和方法

1.1　材料

肿瘤组织 1994 年 11 月～1996 年 1 月取材于华西医科大学附一院，1996 年 10 月～1999 年 7 月取材于重庆医科大学临床学院，均为活检和手术的恶性肿瘤患者，共 56 例。其中，喉鳞癌 40 例，鼻咽鳞癌 16 例。所有病例均经病理证实，并且未行放化疗。取材在无菌条件下进行，选取无钳夹损伤、无脓血的肿瘤组织，大小约 0.5cm×0.5cm×0.5cm，立即放入加有 RPMI－1640 培养液的培养瓶中，保持在 4℃条件下 2h 内送细胞培养。实验所用化疗药物均是临床上常用的药物，包括：顺铂(DDP，云南个旧市生物制药厂)，长春新碱(VCR，鲁南制药厂)，阿霉素(ADM，华明医药有限公司)，

维普资讯 http://www.cqvip.com

环磷酰胺(CTX,浙江海门制药厂),平阳酶素(PYM,天津河北制药厂),氨甲喋呤(MTX,华明医药有限公司),5-氟脲嘧啶(5-FU,天津人民制药厂),丝裂霉素(MMC,日本明治制药株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 抗癌药物应用液的配制 药物浓度为被选药物血浆高峰浓度值的 1×PPC(Peak Plasma Concentration)。DDP 为 3μg/ml,VCR 为 0.5μg/ml,ADM 为 0.4μg/ml,CTX 为 10μg/ml,PYM 为 5μg/ml,MTX 为 4μg/ml,5-FU 为 25μg/ml,MMC 为 1μg/ml。将药物用生理盐水配制成母液,再用培养液配制成工作液,-20℃保存备用。

1.2.2 实验步骤 将肿瘤标本置于无菌平皿中,用 PBS 冲洗 3 次,加入 RPMI-1640 培养液(含青霉素 100μ/ml,链霉素 100μg/ml)12ml,把肿瘤组织剪碎后用吸管反复吹打,用 200 目滤网过滤,加入 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 1×10^6 个。除NS0.1ml设置对照外,每个培养瓶内加入0.1 ml 药物,然后,取细胞悬液 1ml 加入各培养瓶和对照瓶内,摇匀、加盖。培养瓶放于 CO_2 培养箱内 37℃孵育 36h。培养液用 2000g 离心 10min,去上清,将细胞悬液涂片,用无水酒精固定 5min,自然干燥。新鲜配制胶质银工作液(明胶溶于 1%甲酸液使成 2%溶液,再按 1:2 溶积比与 50%硝酸银混合)过滤后滴入切片上,盖满细胞,放入 37℃孵箱孵化 20min,蒸馏水冲洗液终止显色,干燥后油镜计数棕色颗粒。

1.2.3 药敏试验的结果判定 AgNOR 颗粒呈棕黑色,位于细胞核内,背景呈淡黄色。分别计数对照组和加药组细胞核内棕黑色颗粒。

$$均值下降率=\frac{对照组平均颗粒数-加药组平均颗粒数}{对照组平均颗粒数}$$

均值下降率以≥50%为敏感,30%~50%为中度敏感,<30%为耐药。

1.2.4 体内外疗效的判定 化疗方案中有两个或两个以上体外敏感的化疗药物为体外敏感,化疗方案中体外敏感的化疗药物少于两个为体外不敏感;病人化疗后,按照 UICC 的实体瘤疗效判定指标,达到缓解和部分缓解标准为体内敏感,病人未达到缓解和部分缓解标准为体内不敏感。

2 结 果

2.1 可评价率

细胞分离采用单纯的机械分离法,结果显示:此方法简便、快速,获得的单细胞悬液用 0.5%台盼蓝染色检测活细胞数,其细胞存活率为 70%~90%。本试验 56 例标本中,51 例获得药敏结果,其可评价率为 91.1%。失败的原因有:细菌污染 3 例,无细胞生长 2 例。

2.2 肿瘤细胞对化疗药物的敏感性

51 例肿瘤中,有 4 例肿瘤对 8 种化疗药物均耐药,其它 47 例肿瘤分别对 1~7 种药物敏感,没有观察到对 8 种抗癌药物全部敏感的病例。AgNOR 颗粒均值下降率从 0~63%。从表 1 可以看出,在 8 种单一药物中,对 DDP 的敏感率最高,平均抑制率为 40.5%,其它几种药物的敏感性依次为:VCR(36.8%)、5-FU(32.0%)、PYM(31.5%)、CTX(28.2%)、MTX(27.0%)、ADM(25.2%)、MMC(23.7%)。此外,喉癌和鼻咽癌对药物的敏感性不完全一致(见表 2)。喉癌对化疗药物的敏感性顺序为:DDP,5-FU,VCR,MMC,PYM,CTX,MTX,ADM。鼻咽癌对化疗药物的敏感性顺序为:DDP,VCR,PYM,CTX,ADM,MTX,5-FU,MMC。抗癌药物对鼻咽癌的平均抑制率(35.2%)高于对喉癌的平均抑制率(28.1%)($P<0.05$)。

表 1 51 例喉癌和鼻咽癌药敏检测结果

平均抑制率	ADM	PYM	MMC	CTX	5-FU	MTX	VCR	DDP
<30%	31	28	36	25	32	32	22	17
30%~50%	19	18	14	24	12	15	19	21
≥50%	1	5	1	2	7	4	10	13
(%$\bar{x}\pm s$)	25.2±16.4	31.5±14.2	23.7±14.6	28.2±15.1	32.0±22.2	27.0±15.5	36.8±14.7	40.5±15.9

表 2 喉癌和鼻咽癌对化疗药物的敏感性

平均抑制率(%$\bar{x}\pm s$)	ADM	PYM	MMC	CTX	5-FU	MTX	VCR	DDP
喉 癌	19.3±14.0	26.3±13.2	27.0±15.9	25.0±15.7	33.4±26.8	24.5±16.5	33.2±13.8	36.7±14.1
鼻咽癌	36.6±9.1	44.3±8.0	16.3±7.8	38.0±7.3	25.6±7.9	32.9±13.4	46.8±8.3	54.4±10.6

喉癌组和鼻咽癌组比较 $P<0.05$

2.3 体外敏感性和近期临床疗效的对照

10 例喉癌和鼻咽癌行化疗,其中,喉癌 7 例,鼻咽癌 3 例。近期化疗结果显示,体内外均敏感的共 5 例,均不敏感 3 例,体外药敏与体内疗效的总符合

维普资讯 http://www.cqvip.com

率为 80%。药敏结果与远期化疗效果之间的关系尚在进一步研究中。

3 讨 论

临床上如何更好地选择抗癌药物和制定疗效较高的化疗方案是一个亟待解决的临床难题[1]。由于晚期头颈肿瘤无论手术和放疗采用单一或综合的治疗方法,其疗效均不佳,局部失败率可达 25%～50%,远处转移率达 10%～20%[2]。因此,积极探索在手术+放疗的基础上合理地采用化疗,尤其是寻求一种简便易行、准确可靠的实体瘤化疗药物敏感性预测方法,实行个体化治疗,对于改善头颈肿瘤晚期病人的治疗现状,提高临床疗效是十分重要的。多年来,人们不断在寻找一种简便易行、准确可靠的化疗药物敏感性预测方法,致今发展为体内和体外两大系列十多种药敏试验,并且,逐步从动物体内转向体外,从昂贵、费时转向简便、快速。核仁组成区(Nucleolar Organize Regions, NORs)是细胞核糖体基因转录合成核糖体 RNA 的场所[3],AgNOR 计数的变化可反映细胞的增殖活性[4]。很多研究观察到化疗药物治疗后,瘤细胞中 AgNOR 平均计数减少,可作为预测肿瘤化疗效果的参考指标[5]。由于 AgNOR 作为核仁组成区及其 rDNA 转录活动的标志,直接反映了细胞基因转录活性的改变,因此,可以准确、灵敏地反映抗癌药物对肿瘤作用的变化。AgNOR 技术与目前公认的 MTT 法有较好的相关性,两种方法总的符合率为 94.5%[6],但是,AgNOR 检测方法无新鲜肿瘤组织中非肿瘤细胞的干扰,是与 MTT 等方法不同的显著特点[4,5]。此外,本方法试剂价格便宜、技术操作简便、实验周期较短,因而,具有价廉、简易、省时的特点。

本研究根据喉癌和鼻咽癌的生物学及组织病理学特点,应用简便易行的单纯机械分离法分离新鲜肿瘤组织,获得了高存活率的单细胞悬液,实验的成功率高。我们观察到,喉癌和鼻咽癌的药物敏感性有较大异质性,敏感性最高的药物也存在对其不敏感的个体(15/51 例对 DDP 不敏感),敏感性最低的药物也存在对其较为敏感的个体(14/51 例对 MMC 较敏感),结果表明,不同的个体对同一种药物和不同的药物对同一个体的敏感性均不同,因此,进行肿瘤药敏检测,实行喉癌和鼻咽癌个体化治疗非常必要。治疗头颈部恶性肿瘤的药物甚多,几乎包括各种抗癌药。本实验所测得的敏感药物顺序大致与临床结果符合,其敏感性较好的药物如 DDP、VCR、5-FU、PYM 等是目前头颈肿瘤化疗中的首选药物。经 AgNOR 技术测得的喉癌和鼻咽癌的药物敏感顺序不完全一致,且鼻咽癌的敏感性显著高于喉癌($P<0.05$),这提示化疗在鼻咽癌的综合治疗中具有非常重要的作用。本组 10 例患者作了化疗,药敏结果与体内疗效的符合率达 80%,初步显示 AgNOR 技术与临床的相关性较好。由于样本数少,本研究的预测结果与临床疗效的关系有待深入研究。

参 考 文 献

[1] Xu JI, Song SI, Tang ZI. Evaluation of in vitro chemosensitivity of antitumor drugs using the MTT assay in fresh human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1998;49:251-259.

[2] Zidam J. Multidrug chemotherapy using bleomycin, methotrexate and cisplatin combined with radical radiotherapy [J]. Cancer, 1987;59:24-26.

[3] Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, et al. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumor front in oral squamous cell carcinomas[J]. J Pathol, 1997;182:450-456.

[4] Valenca JT Jr, Escanhoel CA, Netze K, et al. AgNOR pattern and PCNA analysis in fine needle biopsies of liver cell carcinoma[J]. Neoplasma, 2001;48:370-373.

[5] Karoly S, Edib K, Andrew VS. Decrease in the AgNOR number in Dunning R3327 prostate cancers after treatment with an agonist and antagonist of luteinizing hormone-releasing hormone[J]. Am J Pathol, 1991;138:1237-1241.

[6] Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, et al. Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using the MTT assay[J]. Br J Cancer, 1992;66:794-798.

[7] 张丽萍,许良中. 体外瘤株嗜银蛋白染色法与 MTT 法化疗敏感性的对比研究[J]. 实用肿瘤杂志, 1997;12:81-83.