维普资讯 http://www.cqvip.com

43例胸部恶性肿瘤的抗癌药敏试验(MTT法)测试结果分析*

第一医院胸外科 秦治明 张泽普 李良彬
肿瘤研究室 骆云鹏 汤为学 王瑞雪

提 要 本文用MTT法对43例胸部恶性肿瘤，其中肺癌37例(含肺癌胸水10例)，食管癌6例进行了体外抗癌药敏检测。实验成功率肺癌实体瘤为92.7%，食管癌为83.3%，肺癌胸水为100%。检测了恶性肿瘤对顺铂、卡铂、丝裂霉素-C、鬼臼乙叉甙、表阿霉素、长春新碱、5-氟脲嘧啶、放线菌素-D和平阳霉素等多种抗癌药物的敏感性。结果表明，同一肿瘤的不同病理类型对同一抗癌药物的敏感性各异，同一病理类型的不同个体对同一抗癌药物的敏感性也不同。

关键词 MTT法；抗癌药敏试验；胸部恶性肿瘤
中图分类号 R730.53

胸部恶性肿瘤，以肺癌和食管癌最为常见尤其是肺癌的发病率逐年上升，治疗效果仍较差，国内外手术切除治疗肺癌的结果表明，五年存活率为30%—40%[1]。目前对肺癌等胸部恶性肿瘤多提倡采用手术、化疗、放疗和免疫治疗等综合疗法。术后化疗虽是全身治疗的重要组成部分，但也还存在如肿瘤异质性及对抗癌药物具多重耐药性等问题，使化疗存在一定盲目性，导致疗效不佳或失败。为此，作者对43例手术切除的肺癌、食管癌实体瘤组织和/或癌性胸水，用MTT法进行体外药敏测试，以指导术后选用化疗药物。现将部分研究结果报告如次：

材料和方法

1. 材料

(1) 肿瘤标本：肺癌、食管癌手术切除瘤组织或癌性胸水(经病理确诊)。

(2) 培养基RPMI-1640(美GIBCO)，灭活新生小牛血清(华西生物制品厂)，青霉素(10万u/L)，链霉素(0.1g/L)。

(3) 四甲基偶氮唑盐(MTT)，胶原酶和DNA酶(美，Sigma)。

(4) 二甲亚砜(DMSO)(北京化工厂)

(5) 抗癌药物：选择术后常用化疗药物及部分新药，包括顺铂(CDDP)、卡铂(CBDCA)、丝裂霉素-C(MMC)、鬼臼乙叉甙(VP-16)、表阿霉素(EDR)、长春新碱(VCR)、5-氟脲嘧啶(5-Fu)、放线菌素-D(ActD)、柔红霉素(DNR)、平阳霉素(PYM)和氨甲喋呤(MTX)等。

(6) 96孔培养板(美，Corning)。

(7) 微量振荡器(WZ-2A)型，北京海淀电子医疗仪器厂)。

(8) 自动酶标读数仪(E2550型，美Bio-Rad)。

2. 方法[2]

无菌条件下切取新鲜肿瘤组织(1cm×1cm×1cm)，清除血块、坏死组织和脂肪，立即用Hanks液洗净，经机械方式和酶法(0.2%胶原酶Ia和

* 重庆市卫生局资助课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

DNA酶)处理，制成肿瘤单细胞悬液。用0.2%台盼兰染色计数活细胞，调整细胞浓度至2－5×10⁵/ml，接种于96孔培养板(200μl/孔)。实验包括试剂对照、肿瘤细胞对照及不同抗癌药物组。抗癌药物浓度ADR、EDR、DNR、VP－16、VCR和MMC为10μg/ml、CDDP、CBDCA为20μg/ml，5-Fu为50μg/ml[3]4，每孔加药20μl，置37℃、饱和湿度、7%二氧化碳孵箱内培养68小时后，500×g离心10min，弃上清，每孔加入200μl RPMI-1640及20μl MTT(5mg/ml)，继续培养4小时，再离心弃上清后，每孔加DMSO200μl，微量振荡器振荡5min。自动酶标读数仪比色(波长600nm)，测出光密度值并计算瘤细胞存活率。计算方式为：

$$瘤细胞存活率=\frac{抗癌药物组光密度值}{细胞对照组光密度值}\times 100\%$$

判断标准：存活率＜30%　提示对该药敏感；

30%—50%　为中度敏感；

＞50%　为耐药；

结　果

1.病理类型　37例肺癌中鳞癌13例，腺癌17例，小细胞癌6例肉瘤化癌1例；6例食管癌中有鳞癌5例，贲门腺癌1例。

2.标本来源与抗癌药敏试验(MTT法)成功率的关系　肺癌实体瘤组织27例，实验结果可供分析者为25例，成功率92.7%；食管癌6例，可供分析者5例，成功率83.3%；肺癌胸水10例，可供分析者10例，成功率100%。

3.体外药敏试验结果　10种药物对肺鳞癌、肺腺癌的作用，结果见表1。

表1－a　肺鳞癌和腺癌药敏试验结果

药物	例次	鳞癌									例次	腺癌					
		高分化型			低分化型			未分化型				高分化型			低分化型		
		敏感	中度敏感	耐药	敏感	中度敏感	耐药	敏感	中度敏感	耐药		敏感	中度敏感	耐药	敏感	中度敏感	耐药
CDDP	13	4/7	2/7	1/7	1/5	2/5	2/5	0/1	0/1	1/1	17	2/13	8/13	3/13	1/4	2/4	1/4
CBDCA	12	5/7	1/7	1/7	2/5	2/5	1/5	—	—	—	10	2/10	4/10	4/10	—	—	—
MMC	13	2/7	1/7	4/7	1/5	0/5	4/5	0/1	0/1	1/1	16	0/13	2/13	11/13	0/3	0/3	3/3
VP－16	12	1/7	2/7	4/7	0/5	1/5	4/5	—	—	—	11	0/11	3/11	8/11	—	—	—
EDR	10	0/4	1/4	3/4	0/6	0/6	6/6	—	—	—	11	2/11	3/11	6/11	—	—	—
VCR	12	0/6	1/6	5/6	0/5	0/5	5/5	0/1	0/1	1/1	17	1/13	2/13	10/13	0/4	1/4	3/4
5－Fu	11	0/6	2/6	4/6	0/4	0/4	4/4	0/1	0/1	1/1	15	1/12	1/12	10/12	0/3	0/3	3/3
ActD	11	2/6	0/6	0/1	1/5	1/5	3/5	—	—	—	10	3/10	2/10	5/10	—	—	—
DNR	1	1/1	0/1	1/1	—	—	—	—	—	—	5	0/3	2/3	1/3	1/2	1/2	0/2
MTX	2	0/1	0/1		—	—	—	0/1	0/1	1/1	7	0/3	0/3	3/3	0/4	0/4	4/4

表1－b　肺鳞癌及腺癌对抗癌药物的敏感性

药物	测试例数	敏感	中度敏感	耐药
		例数(%)	例数(%)	例数(%)
CDDP	30	8(26.7)	14(46.7)	8(26.6)
CBDCA	22	9(46.7)	7(31.8)	6(27.3)
MMC	29	3(10.3)	3(10.3)	23(79.3)
VP—16	23	1(4.3)	6(26.1)	16(69.6)
EDR	21	2(9.5)	4(19.0)	15(71.5)
VCR	29	1(3.4)	4(13.8)	24(82.8)
5—Fu	26	1(3.8)	3(11.5)	22(84.7)
ActD	21	6(28.6)	3(14.3)	12(57.1)
DNR	6	2(33.3)	3(50.0)	1(16.7)
MTX	9	0(0.0)	0(0.0)	9(100.0)

维普资讯 http://www.cqvip.com

此外，结果还显示6例小细胞肺癌，对CDDP敏感或中度敏感者4例；对CBDCA和EDR敏感各有2例；对MMC、VP-16、VCR、5-Fu和ActD均不敏感者4例。食管鳞癌对CDDP及CBDCA、MMC敏感及中度敏感者1例；对PYM敏感者1例；而对VCR、5-Fu、VP-16、ActD均不敏感。

肉瘤化癌1例，对CBDCA、CDDP中度敏感，对MMC、VP-16、VCR、5-Fu、EDR和ActD不敏感。

贲门腺癌1例，对CDDP、CBDCA、MMC、VP-16和5-Fu敏感或中度敏感。

4. 非小细胞肺癌(NSCLC)以CDDP为主的两药交叉耐药(Cross—Resistsnce)情况见表2：

表2 非小细胞肺癌(NSCLC)以CDDP为主的两药交叉耐药(Cross—Resistance)状况分析

药物	标本	S1—S2(%)	S1—R2(%)	R1—S2(%)	R1—R2(%)
CDDP和MMC	29	8(27.6)	14(48.3)	0(0)	7(24.1)
CDDP和VP16	22	7(31.8)	9(40.9)	0(0)	6(27.3)
CDDP和VCR	30	5(16.7)	16(53.6)	1(3.3)	8(26,7)
CDDP和EDR	18	6(33.3)	7(38.9)	0(0)	5(27.8)
CDDP和5Fu	28	5(17.9)	15(53.6)	0(0)	8(28.6)

注：S1—S2:两药均敏感的百分率 S1—R2:对第一种药物敏感对第二种耐药的百分率R1—S2:对第一种耐药，对第二种药物敏感的百分率;R1—R2:对两种耐药的百分率

5. 本组43例中，实验前均无化疗史。除1例因病情危重，未来得及化疗已死亡外，余均按药敏结果显示敏感的药物为主进行治疗。若实验中所选药物均耐药或实验失败者，则按本院既往常规化学疗法进行临床治疗。而实验结果与临床疗效的相关性，正随访观察中。

讨 论

鉴于化疗在肿瘤治疗上的重要地位，国内外学者多年来一直致力于寻求建立一种既可靠又能用于临床的类似抗细菌药物敏感试验的技术，从而指导临床选择有效药物，设计合理的化疗方案，提高疗效，避免使用有毒副作用的无效药物，多年实践证明，体外抗癌药敏试验方法中，以人癌干细胞克隆生成测定技术(Humak Tumor Clonogenic Assay，HTCA)和MTT法倍受青睐极具前景，并已纳入美国国立癌症研究所(National Cancer Institute，NCI)作为常规抗癌药物筛选的方法。其中MTT法具有快速、简便、重复性好并适用于临床等优点。Sargent[4]等报告了白血病细胞体外MTT法测定结果与临床治疗反应的一致性。作者应用MTT法对43例胸部恶性肿瘤进行了抗癌药敏试验，其中37例肺癌中实体瘤和癌性胸水的试验成功率，分别为92.7%和100%，比Suto等[6]报道胃肠道肿瘤成功率(90%)为高；本组中，食管癌成功率亦达83.3%，显示了很强的实用性。

从表1-a中看出，对肺鳞癌敏感的药物有：CBDCA(10/12)、CDDP(9/13)、MMC(4/13)和VP-16(4/12)；对肺腺癌敏感的主要有CDDP(13/17)、CBDCA(6/10)、EDR(5/11)；MTX对肺鳞癌、腺癌均不敏感(分别为0/2、0/7)，这与国外文献报道的非小细胞肺癌(NSCLC)常用CDDP、CBDCA、MMC相一致。结果还表明，同一肿瘤的不同病理类型对同一抗癌药物敏感性不一样，同一病理类型的不同个体分化程度不一、对同一抗癌药物的敏感性也不同见表1-a。从而提示，由于患者个体差异和肿瘤的异质性，宜根据抗癌药敏试验结果决定临床用药，可减少用药的盲目性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

目前国内外文献报道的NSCLC化疗多提倡以CDDP为基础的联合方案[6]已有动物实验证明，CDDP和VP-16有协同作用 (Synergistic effect)[7]。我们分析了本实验中NSCLC以CDDP分别同MMC、VP-16、VCR、EDR和5-Fu的两药交叉耐药(Cross-Resistance)的情况。从表2中可以看出，对两药均敏感的百分率依次为：CDDP和EDR(33.3%)，CDDP和VP-16(31.8%)，CDDP和MMC(27.6%)，CDDP和5-Fu(17.9%)，CDDP和VCR(16.7%)；两药均耐药的情况为25%左右，对CDDP耐药而对其它药物敏感者较少。这些结果支持NSCLC化疗以CDDP为主的联合用药方案。而且，有助于深入认识不同类型肿瘤对不同抗癌药物耐药抑或敏感的可能反应模式，而对选择最佳治疗的联合方案提供有价值的依据[8]。

作者应用MTT法所获初步结果与目前在肺癌治疗中以CDDP为主[9]，食管癌治疗以CDDP、PYM为主的化疗方案相一致。而药敏试验与临床治疗远期效果之间的相关关系，正进一步观察随访中。

参 考 文 献

1. 黄孝迈，主编．现代胸外科学 北京 人民军医出版社 1991;116
2. 王瑞雪，骆云鹏，汤为学，等．重庆医科大学学报 1992;(1):89
3. Shimoyamn, et al. J. Surg Oncol, 1989;41(1):12-1
4. Sargent J. M, et al. Br. J. Cancer 1989;60(2):206
5. Suto A, et al. J. Surg Oncol 1989;42(1):28
6. Danide J, et al. Curr Probl Cancer 1991;15(3):127
7. Schabel F. M, et al. Cancer Treat Rep 1979;63:1459
8. Salmon S. E, et al. Cloning of Human Tumor Stem Cells. Alan R. Liss, Inc, 1980, 9223
9. 秦治明，张泽普．重庆医学 1993;22(1):45

(致谢：本文承蒙本院胸外科、肺科和学校肿瘤研究室同志的大力支持及汪斌、邵静同志协助部分工作，特此致谢。)

(收稿日期 1993-09-22)

ANTICANCER DRUG SENSITIVITY TEST BY MTT COLORIMETRIC ASSAY FOR THORACIC TUMOR

Qing Zhiming, et al

Dept. of Cardiothoracic Surgery, The First Hospital

43 samples of thoracic tumor (27 of the lung solid tumor, 10 of the pleural effusion, 6 of the esophagus) were tested by MTT assay. The measurable rate of lung solid tumor was 92.7% and that of esophagul cancer was 83.3%, 100% of the plueral effusion. Results showed that different sensitivities were tested for the fresh tumor specimens to agents (CDDP, CBDCA, MMC, VP-16, EDR, VCR, 5-Fu, ActD and PYM). The results signify that sensitivity of the different tumor types and different individuals of the same tumor type varies.

KEY WORDS MTT colorimetric assay; Anticancer drug sensitivity; Thoracic tumor