维普资讯 http://www.cqvip.com

281-284

抗癌药物敏感试验（MTT法）在胃肠道恶性肿瘤化疗中的临床应用△

第一医院普外科 殷玉炳 罗崇德 韩文妙 郝解非

肿瘤病理生理研究室 骆云鹏 汤为学 王瑞雪

R735.05

提 要 作者采用抗癌药药敏试验（MTT法），对33例胃肠道癌（25例结直肠癌，8例胃癌）进行6种抗癌药药物敏感性测定。结果表明：除4例因取样不足，组织培养不理想或培养污染外，检6成测功获者 7.6%；5-Fu、MMC在其余23例结直肠癌体外药敏试验中，显示敏感者分别为8.7%和21.7%；6例胃癌为16.7%和33.3%，该测试系统进一步证明，瘤细胞对抗癌药的反应存在着明显个体差异。本法有快速、简便、重复性好的优点，值得临床应用与推广

关键词 胃肠道癌；抗癌药药敏试验；MTT法；化疗 胃肿瘤，肠肿瘤，药物疗法

中图分类号 R735

化疗是当前胃肠道癌肿综合治疗的重要组成部份，但还存在着众多亟待解决的问题，如某些抗癌药物对瘤细胞的作用特异性较差，对正常细胞也可造成损伤而毒副作用较大，不少病人对某些抗癌药物有不同程度、原因及类型的耐药性，由于实验室缺乏客观而科学的方法指导临床用药，而使临床抗癌药物的使用存在一定盲目性。为此，我们对本院经手术切除的33例胃肠道肿瘤采用MTT法作体外肿瘤细胞化疗药物敏感性检测[1,2]，藉以指导临床用药，提高疗效，避免了无效的化疗，并减少不必要的药物毒副作用。本法具有快速、简便及重复性好等优点。兹将我们的实验结果初步报告如下：

材料和方法

1. 材料

（1） 肿瘤样本 取自手术刚切下的胃或结直肠癌瘤组织，包括胃癌8例，结肠癌8例，直肠癌16例和肛管癌1例。所有33例均无化疗或放疗往史。

（2） 培养液 RPMI-1640(美国,GIBCO)，含10%灭活新生牛血清(本校微生物教研室提供)、青霉素（10万u/L）和链霉素(0.1g/L)。

（3） 四甲基偶氮唑盐(MTT),胶原酶和DNA酶(美国，Sigma)。

（4） 二甲亚砜(DMSO,北京化工厂)。

（5） 抗瘤药物 丝裂霉素C(MMC，日本协和发酵工业株式会社)、柔红霉素（DNR，意大利Farmitalia)、氨甲喋呤(MTX，上海第十二制药厂)、长春新碱（VCR，上海第十一制药厂)、鬼臼乙叉甙（VP_{16}，江苏连云港制药厂）和5-氟脲嘧啶(5-Fu，天津市人民制药厂)。

（6） 微量振荡器（WZ-2A型，北京海淀电子医疗仪器厂)。

（7） 自动酶标读数仪(Bio-RadE2550型)。

（8） 96孔无菌培养板(美国，Corning)。

2. 方法

（1） 抗癌药药敏试验（MTT法） 无菌切取新鲜瘤组织约1cm³，立即放入含有10%新生牛血清

△四川省教育委员会资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

的RPMI-1640培养液内，在超净台上清除脂肪、纤维结缔组织、血块和坏死组织、Hanks液洗净，并以机械方法及0.2%胶原酶和0.002% DNA酶予以处理，制成肿瘤单细胞悬液。洗涤二次，台盼兰染色，计算活细胞数，调整细胞数至5×10^4～5×10^6个/ml。将瘤细胞接种于96孔培养板内，每孔加细胞悬液200μl，实验包括试剂对照组、肿瘤细胞阴性对照组，肿瘤细胞阳性对照组（加Lectin）及不同抗癌药物组。各种抗癌药物按规定稀释为三种不同浓度，每种浓度含三个平行孔，每孔加抗癌药物20μl，置入37℃、饱和湿度、7% CO_2孵育箱内培养68 h，取出、500×g离心10 min，弃上清，每孔加200μlRPMI-1640液及20μlMTT(5mg/ml)，继续培养4h，取出离心，弃上清，每孔加DMSO 200μl，用微量振荡器振荡5 min，在自动酶标读数仪上比色(波长600nm)[1]，测每孔光密度值。计算方法：

$$\text{肿瘤细胞存活率}=\frac{\text{抗癌药物组光密度值}}{\text{肿瘤细胞阴性对照组光密度值}}\times100\%$$

肿瘤细胞存活率<30%提示该肿瘤对所试抗癌药高度敏感；存活率30%～50%为中度敏感；存活率>50%为不敏感[3]。

（2）病理组织学检查　瘤组织按Stemberg法进行病理分类[4]。

结　果

我们采用MTT法，对33例胃肠道癌(25例结直肠癌、8例胃癌)进行了抗癌药物敏感试验。25例肠癌中，药敏试验测试成功者23例(成功率92.0%)，1例肛管鳞形细胞癌因取材过少和1例腺癌因培养系统中细胞生长不良，故未能用于分析；8例胃癌中，6例成功（成功率75.0%），2例失败于霉菌污染。33例胃肠道癌总检测成功率87.9%。

实验所测试各类抗癌药对胃肠道癌肿瘤细胞的抑制作用见表1和表2。

表1　抗癌药对结直肠癌瘤细胞存活率的影响

药物	测试例数	瘤细胞存活率<30% 例数(%)	瘤细胞存活率30%～50% 例数(%)	瘤细胞存活率>50% 例数(%)
5-Fu	23	2(8.7)	13(56.5)	8(34.8)
MMC	23	5(21.7)	5(21.7)	13(56.5)
VCR	17	1(5.9)	4(23.5)	12(70.6)
DNR	16	0	2(12.5)	14(87.5)
MTX	13	0	2(15.4)	11(84.6)
VP_{16}	12	1(8.3)	6(50.0)	5(41.7)

表2　抗癌药对于胃癌瘤细胞存活率的影响

药物	测试例数	瘤细胞存活率<30% 例数(%)	瘤细胞存活率30%～50% 例数(%)	瘤细胞存活率>50% 例数(%)
5-Fu	6	1(16.7)	2(33.3)	3(50.0)
MMC	6	2(33.3)	1(16.7)	3(50.0)
VCR	6	0	1(16.7)	5(83.3)
DNR	5	1(20.0)	1(20.0)	3(60.0)
MTX	5	0	0	5(100.0)
VP_{16}	2	0	1(50.0)	1(50.0)

本研究25例结直肠癌中，腺癌22例（Ⅰ级6例，Ⅱ级13例，Ⅲ级3例），粘液腺癌2例和鳞癌1例；8例胃癌中，肠型腺癌和粘液腺癌各4例。抗癌药对各型胃和结直肠癌的作用

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3　抗癌药对各型胃肠道癌的作用

药物	瘤细胞存活率	Ⅰ级结直肠腺癌	Ⅱ级结直肠腺癌	Ⅲ级结直肠腺癌	粘液腺癌	肠型胃癌	粘液性胃癌
5-Fu	<30%	0/23	2/23	0/23	0/23	0/6	1/6
	30%～50%	5/23	5/23	1/23	2/23	1/6	1/6
	>50%	1/23	5/23	2/23	0/23	1/6	2/6
MMC	<30%	2/23	2/23	0/23	1/23	1/6	1/6
	30%～50%	2/23	2/23	1/23	0/23	0/6	1/6
	>50%	2/23	8/23	2/23	1/23	1/6	2/6
VCR	<30%	1/17	0/17	0/17	0/17	0/6	0/6
	30%～50%	0/17	3/17	0/17	1/17	0/6	1/6
	>50%	3/17	5/17	3/17	1/17	2/6	3/6
DNR	<30%	0/16	0/16	0/16	0/16	1/5	0/5
	30%～50%	1/16	1/16	0/16	0/16	0/5	1/5
	>50%	3/16	7/16	3/16	1/16	1/5	2/5
MTX	<30%	0/13	0/13	0/13	0/13	0/5	0/5
	30%～50%	0/13	1/13	0/13	1/13	0/5	0/5
	>50%	3/13	6/13	2/13	0/13	2/5	3/5
VP16	<30%	0/12	0/12	1/12	0/12	—*	0/2
	30%～50%	3/12	2/12	1/12	0/12	—*	1/2
	>50%	1/12	2/12	1/12	1/12	—*	1/2

* 未测

注：因药源或部分病例瘤细胞数量不足，致使各抗癌药病例数不均衡。

详见表3。

讨　论

多年来，许多国内外学者致力于寻求一种可靠实用的抗癌药药敏试验，以提高癌肿病者的化疗效果，并避免因盲目选用某些无效化疗药物而引起不必要的毒副作用。人癌干细胞克隆生成测定技术(Human Tumor Clonogenic Assay, HTCA)和MTT法目前颇受重视。Sargent等(1989)用MTT法对21例次急性髓细胞性白血病病人进行药敏检测，除2例次外，19例次药敏与疗效有显著的相关性；其中10例次体外检测敏感者，临床用药后病情缓解；9例次体外检测耐药者，临床用药亦无效；他们还证实体外药敏程度与用药后白血病细胞清除率有明显相关性[5]。可见抗癌药药敏试验具有重要的临床实用价值。

我们采用MTT法，对33例胃肠道癌(25例结直肠癌，8例胃癌)进行了抗癌药物敏感试验。25例结直肠癌中，药物试验测试成功者23例（成功率92.0%），1例肛管鳞癌因取材过少和1例腺癌因培养系统中细胞生长不良，故未能用于分析。8例胃癌中，6例成功(成功率75.0%)，2例失败于霉菌污染。33例胃肠道癌总检测成功率为87.9%，与Suto等（1989）报道的90%相近[6]，而显著高于目前国内用其它方法进行检测的结果(46.5%)[7]。

本研究结果表明：5-Fu在肠癌体外药敏试验中显示敏感者仅8.7%，胃癌则为16.7%，与国外多数学者报道的临床使用5-Fu于这类癌肿的有效率7%～17%相仿[8]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在药敏试验中，结直肠癌对MMC显示敏感者为21.7%(5/23)，而胃癌为33.3%(2/6)，与俞鲁谊报道的临床使用该药有效率24%(24/98)相近[9]。以上资料提示，抗癌化疗药物5-Fu、MMC对胃肠道癌的体外药敏试验与目前临床用药所获疗效是一致的。至于药敏试验与临床治疗远期效果之间的关系有待进一步观察随访。

根据我们所用各种药物对各型胃和结直肠癌作用的测试结果（表3），不仅同一种肿瘤对不同抗癌药的敏感性并不相同，而且相同组织学类型，甚至相同分化程度的肿瘤(如同为结直肠腺癌Ⅰ级）发生于不同病人时，他们对同一种化疗药物的反应性也可不同。这说明抗癌药物的疗效存在着明显的个体差异。因此，临床对患有同一类型肿瘤的不同个体，在选择抗癌药物时，应根据药敏结果，结合肿瘤病期及脏器功能等状况，选用恰当的抗癌药物进行治疗，才能取得更为满意的疗效。

参 考 文 献

[1] 王瑞雪，等.重庆医科大学学报 1991，16(4)：330

[2] 汤为学，等. 重庆医科大学学报 1992；17(2)：103

[3] Salmon SE. Cancer Treat Rep. 1984，68(1)：117

[4] Stemberg SS. Diagnostic surgical pathology. Lst ed Raven Press, New York, 1989；937～1056

[5] Sargent JM, Taylor CG. Br J cancer 1989；60：206

[6] Suto A, et al. J Sury Oncol 1989；42(1)：28

[7] 李珊珊，等. 河南肿瘤学杂志 1991；4(2)：10

[8] 大江裕一郎，他. Medico 1991，22：9426

[9] 俞鲁谊. 实用癌症杂志 1986；1(1)：1

(收稿日期 1992-03-10)

ANTINEOPLASTIC DRUG SENSITIVITY TEST (MTT ASSAY) IN CHEMOTHERAPY OF GASTROINTESTINAL MALIGNANCY-A REPORT ON PRELIMINARY CLINICAL APPLICATION

Yin Yubing, et al

Dept. of Surgery, The First Hospital

Thirty-three cases of gastrointestinal cancers, 25 colorectal and 8 gastric, were subjected to MTT assay using 6 antineoplastic drugs in vitro. Excluding 4 cases, 2 colorectal and 2 gastric, in which the assay failed because of insufficient sampling, unsatisfactory tissue culture or contamination of the cultures, the assay succeeded in 87.9% of cases in this group. The sensitive rates for 5-fluorouracil and mitomycin C in colorectal cancers were 8.7% and 21.7% and those in gastric cancers were 16.7% and 33.3%. Further studies showed that there existed significant individual differences in the response of tumor cells to different drugs. We concluded that MTT assay had the advantages of quick and simple manipulation and easy to repeat, and it was suggested that it should be popularized clinically in the treatment of malignancy

KEY WORDS Gastrointestinal tumor; Antineoplastic drug sensitivity test; MTT assay; Chemotherapy